



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555421_0042

CHARAKTERISIERUNG VON TRANSKRIPTIONSEINHEITEN
AUS *S. CEREVISIAE*; GENSTRUKTUR VON AKY2, PFY UND GCY;
ANALYSE IHRER PROMOTOREN UND EINES PROMOTERÄHNLICHEN
ELEMENTS IN DER 5'-REGION DES 25S rRNA-GENS

Dissertation

der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von
Viktor Magdolen
aus München

September 1988

- . Berichterstatter: Prof. Dr. W. Bandlow
- . Berichterstatter: Prof. Dr. H. Jäckle

ag der mündlichen Prüfung: 8. 11. 1988

Aus aktuellen Gründen wurden Teile dieser Arbeit bereits veröffentlicht bzw. sind in Vorbereitung:

Strobel, G., Magdolen, V., Oechsner, U., Huh, H. and Bandlow, W. (1988)
The 5'-upstream region of the yeast 25S rRNA gene contains a promoter element allowing expression in yeast and *E. coli*
Curr. Genet., im Druck

Magdolen, V., Oechsner, U. and Bandlow, W. (1987)
The complete nucleotide sequence of the gene coding for yeast adenylate kinase
Curr. Genet. 12, 405-411

Bandlow, W., Strobel, G., Zoglowek, C., Oechsner, U. and Magdolen, V. (1988)
Yeast adenylate kinase (AKY2) is active simultaneously in mitochondria and cytoplasm and is indispensable for non-fermentative growth
Eur. J. Biochem., im Druck

Oechsner, U., Magdolen, V., Zoglowek, C., Häcker, U. and Bandlow, W. (1988)
Yeast adenylate kinase is transcribed constitutively from a promoter in the short intergenic region to the histone H2A-1 gene
FEBS Lett., im Druck

Oechsner, U., Magdolen, V. and Bandlow, W. (1987)
The cDNA and deduced amino acid of profilin from *Saccharomyces cerevisiae*
Nucleic Acids Res. 15, 9078. Corrigendum, 1988. Nucleic Acids Res. 16, 1232

Magdolen, V., Oechsner, U., Müller, G. and Bandlow, W. (1988)
The intron containing gene for yeast profilin (PFY) encodes a vital function
Mol. Cell. Biol., im Druck

Oechsner, U., Magdolen, V. and Bandlow, W. (1988)
A nuclear yeast gene (GCY) encodes a polypeptide with high homology to a vertebrate eye lens protein
FEBS Lett. 238, 123-128

Magdolen, V., Oechsner, U., Trommler, P. and Bandlow, W. (1988)
Expression of a novel yeast protein with homology to mammalian aldo/keto reductases is controlled by galactose at the transcriptional level
in Vorbereitung

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen

A) EINLEITUNG	1
B) MATERIAL UND METHODEN	11
C) ERGEBNISSE UND DISKUSSION	29
TEIL I: <u>Analyse des genomischen rDNA-Klons pQHC7</u>	29
1. Einführung	29
2. Herstellung und Charakterisierung der Subklone pQCC320, pQCV650 und pQKV450	30
3. Konstruktion von rDNA/lacZ-Fusionsgenen	35
4. Test der β -Galaktosidaseexpression der rDNA/lacZ-Fusionsgene in Hefe	38
5. Bestimmung der 5'-Enden der gebildeten Transkripte der rDNA/lacZ-Fusionsgene in <i>E. coli</i> und Hefe, sowie der 25S rRNA in Hefe	41
6. Diskussion	47
TEIL II: <u>Analyse des Klons pUHC3-12</u>	51
1. Einführung	51
2. Herstellung von Subklonen aus pUHC3-12 und Identifizierung des Adenylatkinasegens	52
3. Analyse der 5'- und 3'-flankierenden Regionen des AKY-Gens	55
4. Codonauswahl und Vergleich mit dem AK-Gen aus <i>E. coli</i>	58
5. Analyse der abgeleiteten Proteinsequenz des AKY-Gens	62
6. Gendisruption von AKY und Analyse des Phänotyps	66
7. Herstellung eines AKY/lacZ-Fusionsgens und Untersuchung der Expression in Hefe	71
8. Analyse des Histon H2A-1 Gens (HTA1) und des intergenischen Bereichs zwischen HTA1 und AKY	76
9. Diskussion	80

TEIL III: <u>Analyse des Klons pUHC15-2</u>	88
1. Einführung	88
2. Analyse des linken Arms von pUHC15-2	91
2.1. Herstellung der Subklone und Sequenzierung des linken Arms von pUHC15-2. Identifizierung des Gens für Profilin	91
2.2. Das Intron des PFY-Gens	93
2.3. Analyse des PFY-spezifischen cDNA-Klons pMAC15	94
2.4. Analyse der 5'- und 3'-flankierenden Region des PFY-Gens	98
2.5. Analyse der abgeleiteten Proteinsequenz des PFY-Gens	101
2.6. Gendisruption von PFY	104
2.7. Konstruktion eines PFY/lacZ-Fusionsgens und Untersuchung der Expression in Hefe	108
2.8. Der Mbo II-Cluster in der 5'-flankierenden Region des PFY-Gens	113
2.9. Diskussion	116
3. Analyse des rechten Arms von pUHC15-2	121
3.1. Herstellung der Subklone und Sequenzierung des rechten Arms von pUHC15-2. Identifizierung des GCY-Gens	121
3.2. Analyse der 5'- und 3'-flankierenden Region des GCY-Gens	121
3.3. Analyse der abgeleiteten Proteinsequenz des GCY-Gens	126
3.4. Disruption des GCY-Gens	131
3.5. Konstruktion eines GCY/lacZ-Fusionsgens und Untersuchung der Expression in Hefe	134
3.6. Konstruktion von Deletionsmutanten im Bereich von GCY	139
3.7. Untersuchung des 5'-oberhalb des UAS _e -Elements liegenden Bereichs von pUHC15-2	146
3.8. Diskussion	149
D) VERGLEICHENDE DISKUSSION DER ANALYSIERTEN GENSTRUKTUREN	156
E) ZUSAMMENFASSUNG	166
F) LITERATUR	170

ABKÜRZUNGEN

δ -ALA	δ -Aminolävulinat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
Cl	Curie
cpm	"counts" pro Minute
DIX	Deuteroporphyrin IX
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β -aminoethylether)-tetraacetat
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
min	Minuten
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	optische Dichte
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylflorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
RT	Raumtemperatur
TeMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Enzymeinheit (unit)
rpm	Umdrehungen pro Minute
XGal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid

NOMENKLATUR DER GENE:

AKY2	codiert für	(mitochondriale) Adenylatkinase
PFY		Profilin
Gcy		ein ρ -Crystallin-ähnliches Protein, wahrscheinlich eine Aldo/Keto-Reduktase
HTA1 (HTB1)		Histon H2A-1 (H2B-1)
CYC1 (CYC7)		iso-1 (iso-2) Cytochrom c



A> EINLEITUNG

Die Initiation der Transkription von Strukturgenen in Eukaryonten wird durch eine Anzahl von Proteinen zusätzlich zur RNA-Polymerase II kontrolliert. Diese Transkriptionsfaktoren interagieren mit DNA-Sequenzen, die meist im 'upstream'-Bereich des Gens (im weiteren Verlauf der Arbeit als (5'-)oberhalb des Gens bezeichnet) liegen und zusammengekommen den eukaryontischen Promoter bilden. Der typische eukaryontische Promoter unterscheidet sich erheblich von der prokaryontischen Kontrollregion. Im prokaryontischen System ist der Promoter in einem kurzen Bereich 5'-oberhalb des Gens lokalisiert (Siebenlist et al., 1980; Hochschild et al., 1983). Dieser Bereich zeichnet sich durch eine RNA-Polymerasebindungsstelle aus und kann weitere cis-wirksame Sequenzen enthalten, die mit regulatorischen Proteinen in Wechselwirkung treten. Beispielsweise binden Repressorproteine an die DNA und verhindern mechanisch die Bindung der RNA-Polymerase an den Promoter. Die negative Kontrolle ist bei Prokaryonten das dominierende Regulationsprinzip. Nur wenige Gene stehen unter positiver Kontrolle: hierbei bindet das Aktivatorprotein an die DNA und stimuliert die Transkription wahrscheinlich durch direkten Kontakt mit der RNA-Polymerase.

Die Promoterbereiche regulierter Gene in Eukaryonten sind dagegen viel größer. Sequenzen, die für maximale Transkription verantwortlich sind, können hundert bis mehrere tausend Basen von der Initiationsstelle der Transkription entfernt positioniert sein. Diese cis-wirksamen Sequenzen (auch Enhancer oder (bei Hefe) Upstream Activation Sites genannt) besitzen mehrere gemeinsame Eigenschaften: der Abstand dieser Elemente zur Initiationsstelle der Transkription ist variabel, und die Elemente wirken in beide Richtungen (Serfling et al., 1985). Neben diesen Enhancerelementen ist die hoch konservierte TATA-Box für die effiziente Transkription notwendig. In höheren Eukaryonten ist dieses Element 25-32 bp (Breathnach & Chambon, 1981), in Hefe 40-120 bp (Struhl, 1987), 5'-oberhalb des Transkriptionsstarts lokalisiert. Die Promotoren vieler

sogenannter 'Housekeeping'-Gene in Säugern besitzen allerdings keine TATA-ähnlichen Elemente; sie zeichnen sich durch einen hohen GC-Gehalt aus. Diese Promotoren liegen vor Genen, die für essentielle, metabolische Funktionen codieren, und bewirken eine relativ niedrige Transkriptionsrate, sind wenig reguliert und nicht gewebespezifisch (Dyner, 1986). In Hefe wird das Vorhandensein zweier Klassen von TATA-Elementen (T_R und T_C) diskutiert, die eine unterschiedliche Konsensussequenz aufweisen und mit verschiedenen DNA-bindenden Proteinen in Wechselwirkung treten (Struhl, 1987). Die Transkription vieler konstitutiv exprimierter Hefegene wird danach durch das Zusammenwirken von T_C -Elementen und Poly(dA-dT)-Homopolymersequenzen bewirkt. Die Poly(dA-dT)-Sequenzen sind, ähnlich den UAS-Elementen regulierter Gene, 5'-oberhalb der TATA-Elemente lokalisiert und verhindern wahrscheinlich die Ausbildung einer Nucleosomenstruktur in diesem DNA-Bereich (Struhl, 1985). Möglicherweise wird durch die spezifische Bindung von Proteinen eine Struktur stabilisiert, die die Zugänglichkeit der benachbarten Promotoren erleichtert, ohne daß diese homopolymerbindenden Proteine in direkten Kontakt mit dem Transkriptionsapparat treten (Chen et al., 1987).

Zur Aufklärung von Promoterstrukturen und Regulationsmechanismen der Transkription in Eukaryonten hat die Untersuchung an der genetisch hervorragend charakterisierten Hefe *Saccharomyces* viel beigetragen. Ein sehr gut untersuchtes und verstandenes Beispiel in diesem Organismus ist die Regulation der Transkription der Gene, die für Enzyme des Galaktoseabbaus codieren (Oshima, 1982; Johnston, 1987). Galaktose wird in Hefe über eine spezifische Permease (GAL2-Produkt) aufgenommen und mit Hilfe dreier Enzyme des sogenannten Leloir-Stoffwechselweges (Kosterlitz, 1943; Leloir, 1951) zu Glukose-1-Phosphat umgewandelt: Galaktokinase, Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase und Uridindiphosphogalaktose 4-Epimerase (GAL1- GAL7- bzw. GAL10-Genprodukt) sind hierbei beteiligt. Melibiose wird durch die vom Genort MEL1 codierte α -Galaktosidase intrazellulär in Glukose und Galaktose gespalten und somit für die

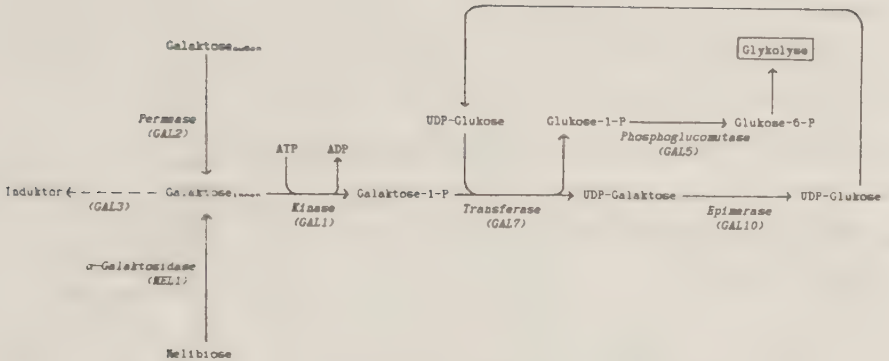


Abb. 1: Der Stoffwechselweg der Galaktoseverwertung in Hefe

Hefe verwertbar. Glukose-1-Phosphat wird schließlich durch die Phosphoglucomutase (GAL5-Produkt) in Glukose-6-Phosphat umgewandelt. Dadurch wird die C-Quelle, ursprünglich als Galaktose (bzw. Melibiose) vorhanden, zugänglich für die Glykolyse gemacht (Abb. 1).

Die Gene GAL1, GAL2, GAL7, GAL 10, MEL1 und GAL80 (s.u.) sind co-reguliert: bei Wachstum auf Galaktose ist die Expression dieser Gene induziert, bei Wachstum auf Glukose dagegen reprimiert. Das Gen GAL5, das für die Phosphoglucomutase codiert, wird in Hefe konstitutiv exprimiert. GAL1, GAL7 und GAL10 liegen geclustert auf Chromosom II, die anderen Gene sind dagegen ungekoppelt (St. John & Davis, 1981). Die koordinierte Kontrolle der Transkription wird von den Proteinprodukten der Gene GAL4 und GAL80 vermittelt: GAL4 codiert für den Aktivator der Transkription, das GAL80-Protein stellt den negativen Regulator dieses Regelkreises dar. Das GAL4-Protein aktiviert die Transkription durch Bindung an DNA-Sequenzen oberhalb der jeweiligen Gene (Bram & Kornberg, 1985;

Giniger et al., 1985). Die Bindungsstellen für das GAL4-Protein (UAS_a), die ca. 17 bp lang sind, weisen untereinander eine hohe Sequenzhomologie auf, besitzen einen nicht ganz perfekten spiegelsymmetrischen Aufbau und liegen zwischen 100 und 400 bp oberhalb der Transkriptionsstartpunkte der entsprechenden Gene (Bram et al., 1986). Die Domänen des GAL4-Proteins, die die Aktivierung der Transkription vermitteln, können von der DNA-Bindungsdomäne getrennt werden (Keegan et al., 1986). Sie liegen zum einen in der Region von Position 148-196 und zum anderen am C-Terminus des Proteins (Pos. 768-881) und besitzen einen hohen Anteil an sauren Aminosäuren. Die DNA-Bindungsdomäne ist dagegen in den ersten 74 N-terminalen Aminosäuren des GAL4-Proteins lokalisiert. Bis zu 80% des gesamten GAL4-Proteins kann deletiert werden, ohne daß die Funktion der Transkriptionsaktivierung verlorengeht (Ma & Ptashne, 1987a). Die Wirkung des GAL4-Proteins beruht wahrscheinlich darauf, daß das Protein nach Bindung an einer spezifischen Stelle im Promoter (UAS_a) des zu kontrollierenden Gens mit seinen beiden sauren Domänen eher unspezifisch mit anderen Proteinen, die an der Transkription beteiligt sind, interagiert (Ma & Ptashne, 1987b). Der lange Bereich zwischen den beiden Domänen (ca. 570 Aminosäuren), der weder zur DNA-Bindung noch zur Transkriptionsaktivierung beiträgt, dient vielleicht dazu, das GAL4-Protein flexibel zu gestalten, damit dieses über variable Distanzen wirken kann. Der Repressor, das GAL80-Protein, interagiert direkt mit dem C-Terminus des GAL4-Proteins (Ma & Ptashne, 1987c): es hat keine DNA-Bindeaktivität und bildet mit GAL4-Protein *in vitro* (in Abwesenheit von DNA und anderen Proteinen) einen Komplex (Lue et al., 1987). Während das GAL4-Gen konstitutiv exprimiert wird, steht das GAL80-Gen unter der Kontrolle des GAL4-Proteins. Der Induktor der GAL-Genexpression ist unbekannt. Durch genetische Analysen konnte jedoch geschlossen werden, daß GAL3 anscheinend für ein Enzym codiert, das die Synthese des Induktors aus Galaktose bzw. einem Folgeprodukt davon katalysiert (Torchia & Hopper, 1986).

Neben dem Galaktose-System sind in Hefe eine Anzahl weiterer Regulationssysteme bekannt, die auf Ebene der Transkription wirken, wie z. B. die allgemeine Aminosäurekontrolle (Jones & Fink, 1983). Bei Aushungerung der Zelle für eine Aminosäure (z. B. Histidin) wird eine ganze Reihe von Genen aktiviert, deren codierte Enzyme an der Biosynthese verschiedener Aminosäuren beteiligt sind. Hierbei bindet der positive Regulator, das GCN4-Genprodukt, an eine Nonasequenz, die im Promoterbereich der kontrollierten Gene liegt (Hope & Struhl, 1985).

Ein weiteres Beispiel für komplexe Regulationsmechanismen auf der Ebene der Transkription ist die Expression hämkontrollierter Gene. Guarente & Mason (1983) konnten erstmals für das CYC1-Gen (es codiert für iso-1-Cytochrom c) zeigen, daß Häm die Expression des Gens über UAS-Elemente reguliert. Im Promoterbereich des CYC1-Gens konnten zwei UAS-Elemente identifiziert werden (UASc1; UASc2), UASc1 tritt in Wechselwirkung mit dem Aktivator HAP1, während UASc2 durch das Zusammenspiel zweier Proteine HAP2 und HAP3 aktiviert wird (Guarente et al., 1984; Olesen et al., 1987; Pfeifer et al., 1987). UASc1 ist hauptsächlich für die Hämkontrolle der Transkription verantwortlich, UASc2 hingegen vermittelt die Induktion bei Wachstum auf nichtvergärbaren Substraten. Es konnte vor kurzem gezeigt werden, daß neben CYC1 das HAP1-Protein mit UAS-Elementen zweier weiterer Gene interagiert, nämlich mit den Promoterbereichen des iso-2-Cytochrom c (Zitomer et al., 1987) bzw. des Cytochrom b₂-Gens (Verdiere et al., 1986).

Durch die koordinierte Kontrolle auf der Ebene der Transkription kann Hefe als einzelliger Organismus seinen Metabolismus rasch an sich ändernden Stoffwechselsituationen anpassen. Doch nicht nur die Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen wird durch komplexe Promoterstrukturen und Protein-DNA Wechselwirkungen gesteuert, auch die zellzyklusspezifische Expression einiger Gene wird durch einen prinzipiell gleichen Mechanismus erzielt. Die Histone H2A, H2B, H3 und H4 sind die Proteinkomponenten des Nukleosoms. Histon mRNA akkumu-

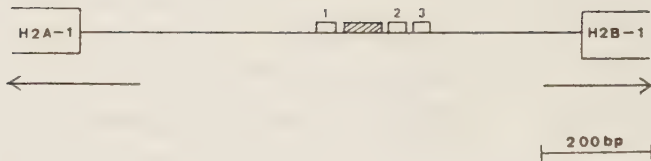


Abb. 2: Aufbau des Promoterbereichs des Histongenpaares H2A-1 - H2B-1. Die Transkriptionsrichtungen sind durch Pfeile gekennzeichnet; die drei Kopien des UAS-Elements sind durch offene Rechtecke, die DNA-Sequenz, für die periodische Repression verantwortlich, ist durch ein schraffiertes Rechteck angedeutet.

liert in der frühen S-Phase im Zellzyklus, zu einer Zeit, in der gleichzeitig die Initiation der Chromosomenreplikation erfolgt (Hereford et al., 1982). Die Verknüpfung zwischen Histon-Genexpression und DNA Replikation wird durch transkriptionale und post-transkriptionale Mechanismen kontrolliert. Die Transkriptionsregulation bestimmt den Zeitpunkt, an dem die Histongene während des Zellzyklus' exprimiert werden: im Falle des H2B-Gens konnte gezeigt werden, daß die Transkription in der späten G1-Phase aktiviert wird und in die frühe S-Phase hineinreicht, um dann stetig geringer zu werden. Schließlich kann während der G2-Phase und Mitose keinerlei Transkription mehr beobachtet werden (Hereford et al., 1982). Zusätzlich zu der transkriptionalen Kontrolle wird die Konzentration der Histon mRNA durch Veränderung der Stabilität der mRNA reguliert (Lycan et al., 1987).

In Hefe existieren je zwei Kopien von H2A- und H2B-Genen; je ein H2A- und H2B-Gen liegen Kopf an Kopf nebeneinander. Diese Genpaare indessen liegen ungekoppelt im Genom vor. Die für die periodische Transkription verantwortlichen Sequenzen konnten an einem dieser Genpaare durch Deletionsanalysen lokalisiert

werden (Osley et al., 1986). Die divergent transkribierten Gene der Histone H2A-1 und H2B-1 (HTA1/HTB1) sind nur durch ca. 800 bp voneinander getrennt (Abb. 2). Durch Verkürzung des Promoterbereichs wurden zwei funktionelle Elemente identifiziert, die sich innerhalb einer 150 bp-Region befinden. Zum einen wurden drei Kopien eines 16 bp langen UAS-Elements lokalisiert. Diese UAS-Elemente werden für die Aktivierung der Histongene benötigt. Zum anderen wurde eine negative, regulatorische Sequenz identifiziert, die aber nur in Verbindung mit UAS-Elementen wirkt und ebenfalls zur periodischen Transkription beiträgt. Die Histon-UAS bzw. das zentrale Motiv davon (GCGAAA) tritt in weiteren Promotoren zellzyklusspezifisch exprimierter Gene auf, wie im Copy I bzw. Copy II Histon H3-H4 Promoter (Smith & Andressen, 1983), und zeigt partielle Homologie zu der Sequenz CACGAAAA, die im Promoterbereich des zellzyklusregulierten HO-Gens mehrfach vorkommt und für dessen periodische Transkription verantwortlich gemacht wird (Breen & Nasmyth, 1985).

Grundlage für die Aufklärung der komplexen Regulation der Expression des HTA1/HTB1-Genpaares war die Herstellung von Fusionsgenen, bestehend aus Promoterbereichen des Genpaares und der codierenden Sequenz des prokaryontischen lacZ-Gens (Osley et al., 1986). *S. cerevisiae* besitzt keine endogene β -Galaktosidaseaktivität, das lacZ-Gen stellt also ein Indikatorgen für Expressionsuntersuchungen in Hefe dar. Die Entwicklung von *E. coli*/Hefe-Shuttlevektoren sowie potenten Hefetransformationsmethoden machten es möglich - analog zu Promoterstudien in Prokaryonten (Berman & Beckwith, 1979; Ptashne et al., 1980) -, die für maximale Transkription und Regulation notwendigen Bereiche durch Herstellung von Deletionen u. ä. im Promoterbereich der Fusionsgene und Messung der resultierenden β -Galaktosidaseaktivität in Hefe zu identifizieren. Die lacZ-Fusionsmethode (Guarente & Ptashne, 1981; Guarente, 1983) wurde in Hefe erstmals zur systematischen Suche nach essentiellen Bereichen in der Promotorregion des CYC1-Gens angewandt und wurde in der Folgezeit u. a. auch bei den

Analysen der Promoterstrukturen der durch Galaktose kontrollierten Gene (Yocum et al., 1984) verwendet.

Das Ziel unserer Arbeitsgruppe war - neben den bisher bekannten häm-kontrollierten Genen - weitere Gene zu isolieren, deren Transkription positiv durch Häm reguliert wird. Beabsichtigt war, analog zu der umfassenden Analyse der galaktose-regulierten Gene und der Gene, die unter der allgemeinen Aminosäurekontrolle stehen, zur Klärung des Mechanismus der Aktivierung der Transkription durch Häm beizutragen. Neben den Genen, die für iso-1 bzw. iso-2 Cytochrom c und Cytochrome b₂ codieren, wurden für einige andere, wie z. B. die Katalase A- und T- (Richter et al., 1980; Spevak et al., 1986), Superoxiddismutase (Marres et al., 1985), δ -Aminolävulinatsynthase (Keng & Guarente, 1987) Gene sowie einige Gene, die für Untereinheiten der Cytochromoxidase codieren (Gollub & Dayan, 1985), Hinweise gefunden, daß diese ebenfalls durch HAP1 und/oder HAP2/HAP3 kontrolliert werden. Der Transkriptionskontrolle durch Häm könnten weitere Gene unterliegen, die für andere Atmungsenzyme oder Hämoproteine oder für an deren Maturation beteiligte Enzyme (z. B. Häm-Synthese, Transport in Mitochondrien, Prozessierung, etc.) codieren.

Unsere Arbeitsgruppe versuchte hämregulierte Gene durch kompetitive Hybridisierung einer Hefe-Genbank zu isolieren. Die Methode basiert darauf, daß man beim 'Screenen' der Genbank zwei unterschiedliche mRNA-Populationen einsetzt, zum einen radioaktiv markierte mRNA aus häminduzierten Zellen und zum anderen, als Kompetitor, nicht markierte mRNA aus hämfrei gewachsenen Zellen (Magdolen, 1985; Oechsner, 1986). Diese mRNA-Populationen sollten sich - im optimalen Fall - nur in der Konzentration der mRNAs der durch Häm kontrollierten Gene unterscheiden und daher eine Selektionsmöglichkeit auf hämregulierte Gene darstellen: solche Signale, die mit einem großen überschuß an mRNA aus hämfrei gewachsenen Zellen nicht kompetiert werden können, sind Kandidaten für Klone, die hämregulierte Gene codieren. Die in der δ -Aminolävulinat-Synthetase

defiziente Hefemutante *ole 3* (Bard et al., 1974) wurde hämfrei auf vergärbarem Substrat gezüchtet und entweder direkt (hämfrei) bzw. 2-4 h nach Zugabe von δ -Aminolävulinat [δ -ALA] (häminduziert) RNA isoliert. Nach Durchführung der kompetitiven Hybridisierungsexperimente wurden letztlich drei Klone (pQHC7, pUHC3-12 und pUHC15-2) isoliert, gereinigt und grob charakterisiert (Magdolen, 1985; Schmalix, 1985; Oechsner, 1986; Schricker, 1986). Diese Klone enthielten DNA-Sequenzen, die in hämfreien Zellen deutlich weniger transkribiert werden, als in mit δ -ALA induzierten. Wir konnten jedoch zeigen, daß die Zugabe von δ -ALA nicht nur zur Induktion der Transkription hämregulierter Gene führt, sondern zudem zu einer allgemeinen Aktivierung des Zellmetabolismus durch die Rekonstitution einer funktionellen Atmungskette beiträgt (Schmalix et al., 1986). Diese Sekundäreffekte zeigen sich unter anderem dadurch, daß die Generationszeit der Mutante von 8-9 h nach Zugabe von δ -ALA auf ca. 2.5 h sinkt. Da die isolierten Klone DNA-Sequenzen tragen, die äußerst stark transkribiert werden (Oechsner, 1986; Schricker, 1986), lag die Vermutung nahe, daß es sich um Fehlisolate handeln könnte. Durch das Absenken der Generationszeit nach Supplementierung mit δ -ALA (also Verbesserung des 'Allgemeinzustandes' der Zelle) werden Gene, die im Stoffwechsel eine wichtige Rolle spielen (z. B. die Gene LEU2 und URA3), ebenfalls aktiviert (Schmalix et al., 1986). Aufgrund dieser Ergebnisse wird zur Zeit in unserem Labor versucht, mit Hilfe des Hämanalogs Deuteroporphyrin IX (DIX) anstelle von δ -ALA hämregulierte Gene zu isolieren (R. Lindauer, pers. Mitteilung). DIX besitzt keine Vinyl-Seitenketten, die für den kovalenten Einbau in Hämoproteine des C-Typs notwendig sind. Supplementierung hämfrei gewachsener Zellen mit DIX führt nicht zur Rekonstitution einer funktionellen Atmungskette und damit Verbesserung des 'Allgemeinzustandes' der Zellen. DIX ist jedoch in der Lage, die Transkription hämregulierter Gene, wie z. B. CYC1, zu induzieren. Die Transkription anderer Gene wie z. B. LEU2 bzw. URA3 bleibt jedoch, wie die Generationszeit der Mutante, unbeeinflusst (Schmalix et al., 1986).

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit war, die Promoterstrukturen und etwaige Regulationsmechanismen der Transkription der auf den Klonen pQHC7, pUHC3-12 und pUHC15-2 codierten Gene zu untersuchen. Die Gene sollten zunächst durch Nukleotidsequenzanalyse lokalisiert und die Genstruktur mit 5'- und 3'-flankierenden Regionen charakterisiert werden. Neben der Festlegung der 5'- (und eventuell auch der 3'-) Enden der Transkripte sollte versucht werden, mögliche Initiations- und Terminationssignale zu identifizieren. Durch Herstellung von Promoter/lacZ-Fusionsgenen und Testen der β -Galaktosidaseaktivitäten in Hefe sollte schließlich die Kontrolle der Expression untersucht werden. Es sollte z. B. geprüft werden,

- ob die isolierten Gene durch Häm reguliert werden,
- ob die Expression abhängig von der angebotenen C-Quelle ist oder
- ob es sich um konstitutiv exprimierte Hefegene handelt.

Diese Untersuchungen der Genexpression sollten parallel von U. Oechsner durch direkte Transkriptionsstudien mit Hilfe von Northern Blot-Analysen ergänzt werden. Bei Isolierung eines regulierten Hefegens sollten - durch *in vitro*-Mutagenesen im Promoter des entsprechenden Promoter/lacZ-Fusionsgens - die für maximale Expression und Regulation essentiellen DNA-Sequenzen ermittelt werden. Zudem war beabsichtigt, neben den Promoterstudien, die Funktion der Gene zu identifizieren bzw. näher zu charakterisieren. Hierbei sollten die Herstellung von Gendisruptionsmutanten im Hefegenom und die Untersuchung der resultierenden Phänotypen - neben Sequenzvergleichen mit Datenbanken bekannter Gene bzw. deren Genprodukten - nähere Aufschlüsse über die Funktion der analysierten Gene erbringen.

B> MATERIAL UND METHODEN

I. MATERIAL

1. Verwendete Substanzen und Bezugsquellen

Acrylamid (4x rekrist.)	Serva (Heidelberg)
Agarose	Seakem (Rockland, USA)
6-Aminolävulinat	Sigma (München)
Ampicillin	Sigma (München)
Bacto-Agar	Difco (Detroit, USA)
Bacto-Trypton	Difco (Detroit, USA)
"Bind"-Silan	LKB (München)
Chloramphenicol	Sigma (München)
Deuteroporphyrin IX	Sigma (München)
Ergosterol	Schuchardt (München)
Ficoll	Serva (Heidelberg)
Formamid	Fluka, Neu-Ulm
Genescreen	NEB (Dreieich)
Guanidiniumhydrochlorid	Fluka (Neu-Ulm)
Guanidiniumrhodanid	Fluka (Neu-Ulm)
Hefeextrakt	Difco (Detroit, USA)
Laktat	Fluka, Neu-Ulm
Nitrozellulosefilter	Schleicher & Schuell (Dassel)
N,N'-Methylenbisacrylamid	Roth (Karlsruhe)
PEG 1000	Fluka (Neu-Ulm)
PEG 8000	Sigma (München)
Rindereserumalbumin	Boehringer (Mannheim)
SDS	Serva (Heidelberg)
Sephacryl S-200, S-300	
Sephadex G-50	Pharmacia (Freiburg)
TEMED	Serva (Heidelberg)
Tetracyclin	Sigma (München)
Tween 80	Serva (Heidelberg)
XGal, IPTG	Boehringer (Mannheim)
Yeast Nitrogen Base (Wo)	Difco (Detroit, USA)

Alle anderen Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen. Für Autoradiogramme wurden Filme XAR-5 der Fa. Kodak, β -Max der Fa. Amersham und Cronex der Fa. DuPont verwendet.

2. Radiochemikalien, Nukleotide und Enzyme

γ -[32 P]ATP (3000 Ci/mmol) und α -[32 P]dNTP, bzw. α -[35 S]dATP (je 3000 Ci/mmol) wurden von Amersham (Braunschweig), nicht markierte Nukleotide (dNTPs, ddNTPs, ATP) von der Firma Boehringer, Mannheim bezogen. Die eingesetzten Sequenzierungsprimer waren ein Geschenk von Peter Heinrich (Inst. f. Biochemie, München) und entsprechen den käuflich erwerbbaaren 15-, bzw. 17 b-'UP' und 'RP' (Boehringer, Mannheim). Für Sequenzierungen der Fusionsstelle von Promoter/lacZ-Fusionsgenen wurde ausschließlich der 15 b-'UP' verwendet, der eine im Vergleich zum 17mer in der codierenden Sequenz des lacZ-Gens weiter 3' unterhalb liegende Hybridisierungsstelle besitzt. Heringssperma-DNA wurde von Boehringer (Mannheim) bezogen.

Die verwendeten Restriktionsenzyme stammten überwiegend von der Firma Boehringer (Mannheim), einige von Biolabs (Schwalbach), P-L Pharmacia (Freiburg) und BRL (Eggenstein). Ligase, alkalische Phosphatase, DNA-Polymerase I (Kornberg und Klenow) und RNase wurden ebenfalls von Boehringer bezogen; Lysozym von Sigma; T₄ DNA-Polymerase, Polynukleotidkinase und Reverse Transkriptase (AMV oder MMV) von P-L Pharmacia (Freiburg) und Proteinase K von Merck (Darmstadt). Zymolyase stammte von Seikagaku Kogyo (Tokyo, Japan).

3. *E. coli*-Stämme

JM101	supE, thi, Δ (lac-proAB), (F', traD36, proAB, lacI ⁻ Z Δ M15) (Yanisch-Perron et al., 1985)
JM109	recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, Δ (lac-proAB), (F', traD36, proAB, lacI ⁻ Z Δ M15) (Yanisch-Perron et al., 1985)
JM109W(lac ^o)	Abkömmling des JM109 (Strobel et al., 1988)
DH5 α	Abkömmling des DH1 (Hanahan, 1985)
SF8	recBC ⁻ , lop11, lig, supE, hsdS, leuB ⁻ , thr ⁻ (Maniatis et al., 1982)

4. *S. cerevisiae*-Stämme

D273-10B α	ATCC25657
DczH1-1B a, hem1-1 leu1	Sledziewski et al., 1981
T02 hem1-1 leu2-3	Strobel et al., 1988
AH215 a leu2-112, his3, can ^r	
DL1 α his3 leu2 ura3	
AH22xAH33 a/ α leu2/leu2	
his4/his4 ade2/ADE2	

5. Vektoren:

pUC12/pUC19	Yanisch-Perron et al., 1985
YEpl3	Broach et al., 1979
pEMBLE31	Balderi & Cesareni, 1985
pMC1871	Casadaban et al., 1983
pMAC561	McKnight & McConaughy, 1983

6. Nährmedien

E. coli-Medien:

a) Vollmedium (Angaben pro Liter):

LB	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g

Zur Herstellung von Platten wurde dem Medium jeweils 15g/l Bacto-Agar zugesetzt.

b) Minimalmedium (Angaben pro Liter):

Bacto-Agar	15 g
<u>M9 Salze:</u>	
Na ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0.5 g
NH ₄ Cl	1 g

Der Agar und die M9-Salze wurden getrennt autoklaviert. Nach dem Autoklavieren werden folgende, steril filtrierte Lösungen zugegeben:

1 M MgSO ₄	1 ml
0.1 M CaCl ₂	1 ml
1 % Thiamin-HCl	1 ml
40 % Glukose	5 ml

Hefemedien:

a) Vollmedien:

Vollmedien für die Anzucht von Hefezellen enthielten 1% Hefeextrakt, 50 mg/l Penicillin, sowie entweder 3% Glukose oder 2% Galaktose. Laktatmedium hatte die folgende Zusammensetzung (Angaben pro Liter):

Laktat (90%)	22.0 ml
Glukose	1.0 g
Hefeextrakt	3.0 g
KH_2PO_4	1.0 g
NH_4Cl	1.0 g
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0.5 g
NaCl	0.5 g
$\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0.6 g
FeCl_3 (1%)	0.3 ml
Penicillin	50.0 mg
Der pH wurde mit KOH auf 5.5 eingestellt.	

b) Minimalmedien:

Die, für die Selektion auf Aminosäuredefizienzen, verwendeten Minimalmedien enthielten 1.9 g/l Yeast Nitrogen Base, 0.01 g/l Hefeextrakt, 50 mg/l Penicillin. Sie wurden mit den Aminosäuren supplementiert, auf deren Defekte nicht selektiert wurde. Die Medien enthielten zudem entweder 3% Glukose, 2% Galaktose, 2% Glyzerin oder 2% Raffinose.

Häm-defiziente Hefemutanten wurden in folgendem Medium hämfrei gezüchtet (Angaben pro Liter):

Galaktose	20.0 g
Yeast Nitrogen Base	1.9 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.2 g
K-Citratpuffer (1M, pH4.5)	40.0 ml
Tween 80	2.5 ml
Ergosterol	12.0 mg
Methionin	50.0 mg
Tyrosin	50.0 mg
Leucin	50.0 mg
Penicillin	50.0 mg

Bei der Selektion auf den Gehalt von LEU2-haltigen Plasmiden wurde dem Medium kein Leucin zugegeben.

6. Häufig verwendete Puffer und Lösungen

TBE: 90 mM Tris
90 mM Borsäure
2.5 mM EDTA

SSC: 0.15 M NaCl
0.015 M Na-Citrat
pH 7.0

TE: 10 mM Tris-HCl/pH 7.6
1 mM EDTA

Auftragspuffer für nicht-denaturierende Gele (5x Lösung):

25 % Glycerin
2.5 % SDS
0.25 % Farbstoff (Bromphenolblau)

II. METHODEN

1. Plasmidpräparation aus *E. coli*:

Plasmid-DNA wurde mit Modifikationen nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) gewonnen.

Von 10-20 ml Übernachtskulturen wurden jeweils 2 ml in einem Eppendorfgefäß 30 sec lang abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl Lysispuffer gelöst. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden 200 µl einer frisch zubereiteten Lösung mit 0.2 M NaOH/1 % SDS dazugegeben, vorsichtig gemischt (durch mehrmaliges Umdrehen des Gefäßes) und die Ansätze 5 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 150 µl 5 M K-Acetat/pH 4.8 wurde die Lösung wiederum leicht gemischt und mindestens 30 min in Eiswasser gestellt. Die präzipitierte chromosomale DNA wurde 15 min bei 4°C abzentrifugiert (Eppendorf-zentrifuge). Der Überstand wurde abgenommen und zur Entfernung von Protein mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (P:C:I = 25:24:1, äquibriert mit TE) extrahiert. Die wäßrige Phase wurde mit 2 Volumina Ethanol gefällt (5 min bei RT). Nach Zentrifugation (15 min bei RT) wurde das Pellet in 100 µl RNase-Lösung (1 mg/ml RNase A in TE-Puffer) gelöst und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach zweimaliger Extraktion zum einen mit Phenol/Chloro-

form/Isoamylalkohol, zum anderen nur mit Chloroform/Isoamylalkohol (C:I = 24:1) wurde die Plasmid-DNA mit Ethanol gefällt (1/10 Volumen 4M LiCl und 2 Volumina EtOH) und in TE gelöst (ca. 1µg DNA/µl).

Ausbeute: 10-20 µg je 2 ml Ausgangskultur

Lysispuffer: 25 mM Tris-HCl/pH 8

50 mM Glukose

10 mM EDTA

10 mg/ml Lysozym

2. Reinigung von DNA:

In Anlehnung an die von Maniatis et al. (1982) beschriebene Methode wurden Säulenchromatographien in 1 ml Plastikspritzen durchgeführt. Vor dem Füllen der Spritzen wurden die Ausflußöffnungen über einer Flamme verengt und mit silanisierter Glaswolle verstopft. Als Füllmaterial wurde Sephadex G-50 (Medium) in H₂O oder Sephacryl S-300 in TE verwendet. Mit beiden Trägermaterialien wurden Salze und nicht eingebaute Nukleotide von DNA abgetrennt. S-300 wurde außerdem verwendet, um Polylinkerfragmente und niedermolekulare RNA abzutrennen. Vor der Applikation der Proben muß das Säulenmaterial gepackt werden. Zu diesem Zweck wurden S-300-Säulen 2 min bei 1000 Upm und G-50-Säulen 5 min bei 2000 Upm (Sorvall KC2B, Du Pont) zentrifugiert. Unter den gleichen Bedingungen wurde dann die DNA (in 80-100 µl) zentrifugiert, wobei das Eluat in einem 1.4 ml-Eppendorfgefäß, das in ein Zentrifugenglas gesteckt war, aufgefangen wurde.

3. Restriktionen

Für DNA-Spaltungen wurden meist die vier von Maniatis et al. (1982) vorgeschlagenen Puffersysteme (low, medium und high (NaCl) sowie KCl-Puffer), sonst die von den Herstellerfirmen empfohlenen Puffer verwendet. Bei analytischen Spaltungen wurden 1-2 µg DNA mit 2-4 U Enzym in 10-20 µl geschnitten. Nach Ethanolfällung wurde die DNA auf Agaroseminigelen aufgetrennt und durch Ethidiumbromid angefärbt. Bei präparativen Ansätzen wurden 10-15 µg Plasmid-DNA verdaut, in einem Volumen von 40-100 µl und mit Enzymmengen von 20-40 U. Um die Spaltungen zu kontrollieren, wurde den Restriktionsansätzen nach ca. 1.5 h ein Aliquot (0.5-1 µg DNA) entnommen und auf

einem Agaroseminigel analysiert. War die Restriktion vollständig (nach 1.5 bis 3h), wurde die Reaktion durch Zugabe von EDTA (10-20 mM) gestoppt.

4. Gelelektrophorese, Anfärbung und Isolierung von DNA-Fragmenten

Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurden bei der Gelelektrophorese jeweils Längenmarker mit aufgetragen (meist Hinf I-gespaltene pBR322-DNA oder Rsa I und/oder Taq I-gespaltene pUC19-DNA).

Agarosegele: Elektrophoresen von DNA-Proben wurden in horizontalen 0.8-1%igen Agarosegelen (13.5 cm x 14/20 cm) mit dem Laufpuffer 1xTBE bei 100-150 V durchgeführt.

Polyacrylamidgele: Hier wurden zur Auftrennung von DNA-Fragmenten 5%ige Polyacrylamidgele (20x25 cm) mit einer Dicke von 1.2 mm oder 2.4 mm verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 200-250 V durchgeführt (Laufpuffer 0.5 oder 1xTBE).

Ethidiumbromidfärbung: Agarose- und Polyacrylamidgele wurden in einer Ethidiumbromidlösung (5 µg/ml) gefärbt (10-20 min). Die Gele wurden dann im UV-Durchlicht (302 nm) fotografiert (Gevaton-Pan P230p).

Isolierung von DNA-Fragmenten: DNA-Fragmente wurden in Polyacrylamid- bzw. Agarosegelen aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Gelblöcke mit den DNA-Banden wurden ausgeschnitten und die DNA in der Bio-Trip-Apparatur (Schleicher & Schuell) in die dafür vorgesehene Kammer elektroeluiert (2-3 h bei 200 V, Laufpuffer 0.5 bis 1xTBE). Die aus dieser Kammer entnommene DNA-Lösung (200 bis 300 µl; 0.5-2.0 µg DNA/ml) wurde mit 1/10 Volumen 4M LiCl und 2 Volumina EtOH versetzt und mindestens 30 min bei -20°C gefällt. Alternativ wurden die Gelblöcke in einen Dialyseschlauch gesteckt und die DNA in einer Agarosegelkammer in 0.5 x TBE bei 150 V eluiert (1-2 h). Anschließend wurden die Elektroden kurz (30 sec) umgepolt, um die DNA von der Membran zu lösen. Die Lösung (ca. 0.5 ml) wurde entnommen und mit Isobutanol auf 100 µl eingengt. Durch Säulenzentrifugation wurden die Proben von Salz, Acrylamid- und Butanolresten befreit.

5. Klonierung von DNA

Vorbereitung der Vektoren und Fragmente

Ca. 1 µg des jeweiligen Vektors wurden mit Restriktionsenzymen verdaut. Bei Einfachspaltungen wurden die 5'-Enden des Vektors dephosphoryliert (s.a. II.11.). Nach Doppelspaltungen wurden die Ansätze meist über eine S-300-

Säule zentrifugiert, um die entstandenen kurzen Polylinkerfragmente abzutrennen. Teilweise hatten die Fragmente 3'-überhängende Enden, der Vektor, in den diese kloniert werden sollten, jedoch keine entsprechenden, zu den Enden kompatiblen Restriktionsschnittstellen. Daher wurde diese überhängenden Enden mit Hilfe der T₄ DNA-Polymerase glattendig generiert. Hierzu wurden 0.5-2.0 µg DNA in T₄-Polpuffer in Gegenwart von allen vier dNTPs (je 125 µM) mit ca. 2 U T₄ DNA-Polymerase 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Reinigung der DNA durch Phenol- (P:C:I = 25:24:1), bzw. Chloroformextraktion (C:I = 24:1) wurde die DNA mit Ethanol gefällt und in TE-Puffer aufgenommen.

T₄ Polpuffer: 33 mM Tris-HCl, pH 8.0
 66 mM KCl
 10 mM MgCl₂
 1 mM DTT
 1 mg/ml BSA

Ligationen:

Für Klonierungen wurden für die Ligationen 0.05-0.1 µg Vektor und 0.02-0.05 µg Fragment-DNA eingesetzt (molares Endenverhältnis Vektor:Fragment = 1:5 bis 1:10). In einem Volumen von 20 µl wurde nach Zugabe von 0.3 (Ligation bei überhängenden Enden), bzw. 1 U (glatte Enden) Ligase 1 h bei 4°C und dann über Nacht bei 16 °C inkubiert. Alternativ (bevorzugt bei Ligationen von glatten Enden) wurde die Ligation auch 3.5-4 h bei 25°C durchgeführt.

5x Ligationspuffer: 250 mM Tris-HCl/pH 7.4
 50 mM MgCl₂
 25 % (w/v) PEG 8000
 5 mM DTT
 5 mM ATP

Transformation von E.coli:

a) Herstellung kompetenter Zellen

1 ml einer Übernachtskultur des jeweiligen Stammes wurde 1:100 in LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD₅₅₀ = 0.5 angezüchtet. Die Zellen wurden bei 4°C abzentrifugiert, in 40 ml TfbI-Puffer suspendiert und stammspezifisch in Eiswasser inkubiert (JM-Stämme: 40 min; SF8: 30 min; DH5α: 10 min). Die

Zellen wurden anschließend erneut abzentrifugiert und in 4 ml TfbII-Puffer durch leichtes Schütteln auf Eis suspendiert. Die kompetenten Zellen wurden aliquotiert und bei -70°C eingefroren.

TfbI: 30 mM Ka-Acetat

50 mM MnCl₂

100 mM KCl

10 mM CaCl₂

15 % Glycerin [w/v]

pH 5.8

TfbII: 10 mM Na-MOPS/pH 7.0

75 mM CaCl₂

10 mM KCl

15 % Glycerin [w/v]

b) Transformation

Typischerweise wurden 4 µl eines Ligationsansatzes mit 16 µl TE-Puffer versetzt, mit 50 µl kompetenten *E. coli*-Zellen überschichtet und vorsichtig gemischt. Nach 30 min auf Eis wurden die Ansätze 105 sec bei 37°C erhitzt und 5 min auf Eis abgekühlt. Dann wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und zur Ausprägung der Ampicillinresistenz 1 h (Tetrazyklinresistenz: 30 min) bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden 30 sec in der Tischzentrifuge pelletiert, in 400 µl LB-Medium gelöst und in 100-200 µl-Portionen auf LB-platten mit Ampicillin (100 µg/ml), bzw. Tetrazyklin (15 µl/ml) ausplattiert. Den Agarplatten wurden meist 20 µl X-Gal (4% in Dimethylformamid) und 20 µl IPTG (20 mg/ml) zugesetzt.

6. *in vitro*-Mutagenese mit Bal31

Nach Linearisierung des Vektors (≈ 1 pmol) wurde die DNA in 24 µl H₂O aufgenommen, 6 µl 5x Bal31-Puffer und 10 µl Bal31 (0.2 U/µl in 1x Bal31-Puffer) zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bei 30°C inkubiert und nach 2, 4, 6 und 10 min je 8 µl entnommen und mit 4 µl EGTA versetzt um den Exonukleaseverdau zu stoppen. Der Versuchsansatz war so konzipiert, daß zwischen 50 und 200 bp des Plasmids deletiert wurden. Die verkürzten DNA-Moleküle wurden über Gelelektrophorese gereinigt, eluiert, phenolisiert, EtOH-gefällt und mit Ta-Ligase direkt ohne vorheriges Auffüllen eventueller Einzelstrangenden religiert.

5x Bal31-Puffer: 100 mM Tris-HCl, pH 7.4
 3 M NaCl
 62.5 mM CaCl₂
 62.5 mM MgCl₂
 5 mM EDTA

7. Präparation chromosomaler und Plasmid-DNA aus Hefe

Von einer logarithmisch wachsenden Hefekultur ($\approx 4 \times 10^7$ Zellen/ml) wurden 20 ml abzentrifugiert, mit 10 ml H₂O gewaschen und schließlich in 150 µl SCE-Puffer (1 M Sorbitol, 100 mM Na-Citrat, 60 mM EDTA, pH 7.0) aufgenommen. Der Zellsuspension wurde 10 µl Zymolyase 60000 (3 mg/ml) zugesetzt und so lange (ca. 20-30 min) bei 30°C inkubiert, bis ungefähr 80% der Zellen sphäroplastiert waren. Die Sphäroplasten wurden durch eine möglichst kurze Zentrifugation pelletiert und der Überstand abgenommen. Nach Zugabe von 150 µl GuHCl-Lösung wurde das Pellet suspendiert, 10 min bei 65°C bei gelegentlichem Schütteln inkubiert und die Lösung anschließend langsam auf RT abgekühlt. 150 µl Ethanol wurden zugegeben, das Gemisch 5 min ins Eis gestellt und 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 300 µl Tris-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA) gelöst, mit 30 µl RNase-Lösung (1 mg/ml in TE-Puffer) versetzt und bei 37°C inkubiert. Nach 1 h wurde 30 µl Proteinase K (20 mg/ml H₂O) zugegeben und die Lösung 30 min in ein 65°C warmes Wasserbad gestellt. Nach zweimaliger Phenol- (P:C:I = 25:24:1) und einer Chloroformextraktion (C:I = 24:1) wurde die DNA EtOH-gefällt und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Die, so gewonnene, DNA-Lösung enthielt chromosomale Hefe-DNA, die durch Restriktionsenzyme gut schneidbar war. Auch Plasmide, die *in vitro* konstruiert und in Hefe transformiert worden waren, wurden mit Hilfe dieser Methode nach Holm et al. (1986) aus Hefe re-isoliert. Hierbei wurde lediglich 5 µl der isolierten DNA in die Transformation in *E. coli* eingesetzt.

GuHCl-Lösung: 4.5 M Guanidiniumhydrochlorid
 0.1 M EDTA
 0.15 M NaCl
 0.05% Sarkosyl pH 8.0

8. Gendisruption

Für die spezifische Inaktivierung von Hefegenen (nach Rothstein, 1983)) wurde das Selektionsgen LEU2 (isoliert aus dem Vektor YEpl3) in den N-terminalen Bereich des jeweiligen Gens kloniert, entweder durch Insertion in eine singuläre Restriktionsstelle oder durch Deletion eines Fragments. Dadurch wurde der offene Leserahmen des jeweiligen Gens zerstört (bzw. teilweise deletiert). Das disrumpierte Hefegen (bzw. ein Teil davon) wurde als lineares DNA-Fragment (mit natürlichen Hefe DNA-Enden) isoliert ($\approx 20 \mu\text{g}$) und in entsprechende leu2-Empfängerstämme transformiert.

9. Hefetransformation

Zur Transformation von Plasmiden (z.B. Promoter/lacZ-Fusionsgenen, in den Vektor YEpl3 integriert), bzw. linearer DNA (zur Gendisruption) in Hefe wurden nicht-sphäroplastierte Zellen nach der Methode von Klebe et al. (1983) verwendet.

a) Herstellung kompetenter Zellen

In 10-50 ml Vollmedium wurden die geeigneten Empfängerstämme bis zu einer OD_{600} von 0.6 gezüchtet, 5 min bei 7000 rpm abzentrifugiert und in 5-25 ml Sorbitollösung (1 M Sorbitol; 10 mM Bicin, pH 8.35; 3% Ethylenglykol) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in der Sorbitollösung (1/50 des Ausgangsvolumens) resuspendiert und in 200 μl -Aliquots bei -70°C eingefroren.

b) Transformation

5-10 μg Plasmid-DNA, bzw. ungefähr 20 μg des DNA-Fragments wurden in einem möglichst kleinem Volumen zu den gefrorenen Zellen gegeben und 5 min bei 37°C geschüttelt. Nach Zugabe von 1.5 ml PEG-Lösung (40% PEG 1000; 200 mM Bicin, pH 8.35) und vorsichtigem Mischen wurde die Zellsuspension 1 h bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden anschließend kurz abzentrifugiert, mit 1.5 ml einer NaCl-Lösung (150 mM NaCl; 10 mM Bicin, pH 8.35) gewaschen, in 100 μl der gleichen Lösung resuspendiert und auf geeignete Selektivplatten ausplattiert.

c) Test auf stabile Integration

Hefeklone, die auf Selektivplatten wuchsen, wurden isoliert und mehrere Tage in Vollmedium gezüchtet. Zellen wurden dann zunächst auf Vollmediumplatten ausgestrichen und später auf Minimalplatten umgestempelt. Bei Wachstum aller Hefezellen auf den Minimalplatten war das Selektivgen stabil

in das Genom integriert. War der Selektionsmarker jedoch plasmidcodiert, verloren einige Zellen die Fähigkeit auf Minimalmediumplatten zu wachsen.

10. Messung der β -Galaktosidaseaktivität

a) Methode nach Miller (1972)

1 ml einer logarithmisch wachsenden Hefe- oder *E. coli*-Kultur wurde (nach der Bestimmung der OD₆₆₀) abzentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml Z-Puffer suspendiert. Nach Zugabe von je 50 μ l Chloroform und 0.1% SDS wurde 10 sec in der höchsten Geschwindigkeit gevortext und die Zellsuspension 5 min bei 28°C vorinkubiert. 200 μ l α -Nitrophenol- β -Galaktosid [ONPG] (4 mg/ml in H₂O) wurden hinzugefügt und die Reaktion solange durchgeführt bis eine leichte Gelbfärbung (durch die Spaltung von ONPG in das gelbe α -Nitrophenol und Galaktose hervorgerufen) sichtbar war. Die Reaktion wurde mit 0.5 ml 1 M Na₂CO₃ gestoppt, die Zellen 1-2 min in der Tischzentrifuge pelletiert, der Überstand in eine Plastikkuvette überführt und die OD bei 420 nm gemessen. Die Berechnung der β -Galaktosidaseaktivität erfolgte nach der Formel:

$$\beta\text{-Galaktosidase-aktivität (U/ml)} = \frac{1000 \times \text{OD}_{420}}{\text{Reaktionszeit (min)} \times \text{OD}_{660} \times \text{Volumen der Zellen (ml)}}$$

b) Methode nach Guarente (1983)

Die Zellen von 5 ml einer logarithmisch wachsenden Hefe- oder *E. coli*-Kultur wurden abzentrifugiert, mit 1.5 ml TE-Puffer gewaschen, nochmals abzentrifugiert, in 300 μ l TE (mit 1 mM PMSF) resuspendiert und in vorgekühlte 2.2 ml Eppendorfgefäße, die bis zum Knick mit Glasperlen gefüllt waren, überführt. Die Zellen wurden durch viermaliges Vortexen (höchste Stufe je 1 min, dazwischen je 1 min auf Eis) aufgeschlossen und der Überstand in ein neues Tube überführt. Das Zellpellet und die Glasperlen wurden mit 800 μ l TE-Puffer (mit 1 mM PMSF) nachgespült, die Überstände vereinigt, 2 min bei 4°C abzentrifugiert und 800 μ l des Überstandes entnommen. Davon wurden mit 20-100 μ l eine Proteinbestimmung (Doppelbestimmung) durchgeführt und 200 μ l in den ONPG-Test eingesetzt. Hierbei wurde zu den 200 μ l Proteinlösung 200 μ l 5x Z-Puffer und 600 μ l TE zugefügt (1 ml Endvolumen) und die Aktivität der β -Galaktosidase wie unter a) beschrieben festgestellt. Eine Enzymeinheit (U) stellt diejenige Enzymkonzentration dar, die 1 nmol ONPG pro min bei 28°C hydrolysiert (Die

Zunahme von 0.0045 OD₄₂₀ entspricht der Menge von 1 nmol hydrolysiertem ONPG). Angegeben wird die spezifische Aktivität (U/mg).

Die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivitäten erfolgte prinzipiell in zwei oder drei Parallelansätzen. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der BCA-Methode nach den Angaben des Herstellers (Pierce Chemical Company, USA).

1x Z-Puffer: 60 mM Na₂HPO₄
10 mM NaH₂PO₄
10 mM KCl
1 mM Mg₂SO₄
50 mM β -Mercaptoethanol
vor Zugabe des β -Mercaptoethanols auf pH 7.0 eingestellt.

11. Radioaktive Markierung von DNA

Nicktranslation:

0.2-1.0 μ g der zu markierenden DNA wurde in 36.5 μ l H₂O und 5 μ l NT-Puffer gelöst, mit 1 μ l DNase (8 μ g/ml) versetzt und 5-10 min bei RT vorinkubiert. Nach Zugabe von 2.5 μ l dTTP-, dGTP- und dCTP-Lösung (je 100 μ M) und 1-2 μ l α -[³²P]dATP (10 μ Ci/ μ l, 3000 Ci/mmol) wurden 5 U DNA-Polymerase I dazupipettiert und die Reaktion 2.5-3.0 h bei 18°C durchgeführt (Endvolumen 50 μ l). Anschließend wurde mit 5 μ l 0.5 M EDTA gestoppt, mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und der Ansatz über eine Sephadex G-50-Säule zentrifugiert. Vor Zugabe zur Hybridisierungslösung wurden die nicktranslatierten Proben 5 min bei 95°C erhitzt. Ausbeute: 1-5x10⁶ cpm

10x NT-Puffer: 500 mM Tris-HCl/pH 7.8
50 mM MgCl₂
5 mM β -Mercaptoethanol

Auffüllreaktion von 5'-überhängenden Enden

Die Auffüllreaktion erfolgte in einem Endvolumen von 25 μ l und enthielt in 1x NT-Puffer (s.o.) je 20 μ M dTTP, dGTP und dCTP und 10-15 μ Ci α -[³²P]dATP (3000 Ci/mmol). Die Reaktion wurde mit 1 μ l Klenow-Fragment (5U/ μ l) initiiert und nach 10 min mit 1 μ l 0.5 M EDTA gestoppt. Das Reaktionsgemisch wurde phenolisiert und säulenchromatographisch gereinigt.

Markierung der 5'-Enden mit Polynukleotidkinase:

a) DNA-Fragmente

Zur Entfernung des 5'-Phosphats wurden isolierte DNA-Fragmente (2-5 µg) in einem Volumen von 50 µl (100 mM Tris-Cl/pH 7.9; 10 mM ZnCl₂) mit 1 U CIP ("Calf intestine alkaline phosphatase") inkubiert (30 min bei 37°C, dann 10 min bei 45°C). Nach Zugabe von 3 µl 200 mM EGTA wurde die Probe für 10 min bei 65 °C erhitzt, zunächst mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und anschließend mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert.

Die EtOH-gefällte DNA wurde in H₂O aufgenommen, mit 8 µl 5x Kinasepuffer, 2 µl γ-[³²P]ATP (10 µCi/µl, 3000 Ci/mmol) und 10 U Polynukleotidkinase versetzt und in einem Volumen von 40 µl 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Kinasereaktion wurde durch 5 µl 0.5 M EDTA gestoppt. Nach Extraktion mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde die wässrige Phase über eine Sephadex G-50-Säule zentrifugiert, um freies γ-[³²P]ATP abzutrennen. Ausbeute: 1-5x10⁶ cpm

b) Oligonukleotide

Oligonukleotide werden ohne 5'-Phosphat synthetisiert, daher entfällt die Phosphatasebehandlung.

1.0-1.5 pmol der Oligonukleotide wurden mit 1-2 µl γ-[³²P]ATP (10 µCi/µl, 3000 Ci/mmol) und 4 µl 5x Puffer in einem Endvolumen von 20 µl durch 10 U Polynukleotidkinase markiert. Die Reaktion, sowie die Reinigung der markierten Oligonukleotide erfolgte entsprechend der Endmarkierung der DNA-Fragmente. Es wurden allerdings zwei Säulenzentrifugationen (Sephadex G-50) durchgeführt, da die verwendeten 20 Basen langen Oligonukleotide bei nur einer Zentrifugation nicht vollständig aus den Sephadex G-50-Säulen eluiert wurden. Dazu wurden nach dem ersten Lauf nochmals 100 µl H₂O auf die Säulen aufgetragen und ein zweites Mal zentrifugiert. Ausbeute: 1-5x10⁶ cpm

5x Kinasepuffer: 500 mM Tris-HCl, pH 7.7

100 mM MgCl₂

1 mM EDTA

50 mM DTT

1 mM Spermidin

12. Primerelongation

Zur Bestimmung der 5'-Enden der RNA-Transkripte wurden der radioaktiv markierte DNA-Primer, bzw. das denaturierte DNA-Fragment mit Gesamt-RNA aus Hefe hybridisiert und mit reverser Transkriptase elongiert. Die Primer, bzw. Fragmente enthielten jeweils komplementäre Sequenzen nahe dem 5'-Ende in der codierenden Region des entsprechenden Transkripts.

RNA-Isolierung (Schmalix et al., 1986; Strobel et al., 1988): Logarithmisch wachsende Hefezellen wurden mit Hilfe von Glasperlen in Gegenwart von 4 M Guanidiniumrhodanid, 400 mM β -Mercaptoethanol, 40 mM Na-Acetat, pH 4.8 aufgeschlossen. Der 45000xg Überstand wurde auf ein CsCl-Kissen (10 mM Triethanolamin, 1 mM EDTA, CsCl, $n_D = 1.408$, pH 6.8) aufgetragen und 16 h in einem Beckman 70.1Ti Festwinkelroter zentrifugiert (15°C, 40000 rpm). Die pelletierte Gesamt-RNA wurde mehrmals mit 70% Ethanol gewaschen, in 0.5-1 ml TE-Puffer aufgenommen und 2x mit Ethanol gefällt.

'Annealing'-Reaktion: Die Hybridisierung des zu der jeweiligen RNA komplementären Strangs des radioaktiv markierten DNA-Fragments an die entsprechenden Transkripte erfolgte unter Bedingungen, die die Ausbildung von RNA/DNA- gegenüber DNA/DNA-Hybriden begünstigen (50% Formamid). In einem Endvolumen von 30 μ l (400 mM NaCl; 1 mM EDTA; 35 mM PIPES, pH 6.4; 0.5 U/ μ l RNasin, 50% deionisiertes Formamid) wurden hierbei $1-3 \times 10^6$ cpm radioaktiv markierte DNA und 10-25 μ g Gesamt-RNA zunächst 15 min bei 75-85°C erhitzt (15-25°C oberhalb des T_m -Wertes des DNA-Fragments), dann innerhalb von 2 min auf 5-7°C unterhalb des T_m -Wertes abgekühlt und ungefähr 3 h bei dieser Temperatur inkubiert. Der Hybridisierungsansatz wurde schließlich für kurze Zeit in Eiswasser gestellt, die DNA bzw. RNA durch Zugabe von 2 Volumina Ethanol gefällt (15 min, -20°C), abzentrifugiert und das Pellet mehrmals mit 80% Ethanol gewaschen. Bei Verwendung eines einzelsträngigen DNA-Primers wurde die 'Annealing'-Reaktion in 1x Annealing-Puffer (s. II.13.) in einem Endvolumen von 30 μ l für 15 min bei 37°C durchgeführt.

Die Abschätzung des T_m -Wertes (DNA-Fragmente > 50 bp) erfolgte nach der empirischen Formel:

$$T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6(\log M) + 0.41(\%G + \%C) - 500/n - 0.61(\%FA),$$

wobei M die Salzkonzentration der Hybridisierungslösung (mol/l), n die Länge der kürzesten Kette in der Duplex und FA Formamid darstellt.

Reverse Transkription: Das Pellet des 'Annealing'-Ansatzes (mit dem DNA/RNA-Hybrid) wurde in 17 μ l H₂O (mit 10 U RNasin) gelöst, 5 μ l RTR-

Puffer und 2 µl dNTP-Mix (je 2 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) hinzupipettiert und der an die RNA hybridisierte DNA-Primer mit 10 U Reverse Transkriptase bis zum 5'-Ende des jeweiligen Transkripts elongiert. Die Inkubation erfolgte bei 42°C, nach 30 min wurden nochmals 10 U Reverse Transkriptase dazugegeben. Nach insgesamt 60 min wurde die Reaktion mit 2 µl 500 mM EDTA gestoppt. Durch Zugabe von 15 µl 250 mM NaOH und Erhitzen der Lösung auf 65°C (60 min) wurde die RNA hydrolysiert. Die radioaktiv markierte, elongierte DNA wurde nach einer Phenolextraktion mit Ethanol gefällt, mehrmals mit 80% Ethanol gewaschen und schließlich in 10 µl Auftragspuffer (s. II.14.) aufgenommen. Die cDNA-Produkte wurden in 6% Polyacrylamid/7 M Harnstoffsequenzierungsgelen analysiert.

5x RTR-Puffer: 250 mM Tris-HCl, pH 8.2
500 mM KCl
50 mM MgCl₂
5 mM DTT

13. Southernblot und Hybridisierungen

DNA wurde in 0.8%igen Agarosegelen in 1xTBE aufgetrennt. Die Gele wurden dann 20 min in 0.5 M NaOH/0.15 M NaCl und 20 min in 0.5 M Tris-HCl/pH 8, 0.15 M NaCl inkubiert und anschließend in 0,5xSSC gewaschen. Die DNA wurde durch Kapillartransfer (mit 20xSSC) auf Filter (Genescreen plus, NEN, oder Nitrozellulose, Schleicher & Schuell) übertragen wie von Maniatis et al. (1982) beschrieben. Nach dem DNA-Transfer (16 h über Nacht) wurden die Filter an Luft getrocknet und Nitrozellulosefilter 2-3 h bei 80 °C gebacken. Alternativ wurden die Gele nach der Anleitung von Tsao et al. (1983) direkt für die Hybridisierung eingesetzt. Hierbei wurde das Gel nach der Elektrophorese wie oben behandelt und dann auf einem Gelrockner auf eine Dialysemembran aufgetrocknet. Zur Ablösung des Gels wurde die Membran kurz in Wasser eingetaucht.

Southernhybridisierungen erfolgten in 6xSSC, 10x Denhardt's-Lösung (je 0.2% Ficoll, Polyvinylpyrrolidon und BSA), 0.1 % SDS und 1 mg/ml Heringssperma-DNA. Die Filter oder Gele wurden zunächst 6-18 h bei 65°C Plastikbeuteln prähybridisiert (in ca. 5 ml). Dann wurden die radioaktiv markierten, 3 min bei 95°C denaturierten Proben (mindestens 500000 cpm) zugegeben, die Hybridisierungslösung gut durchmischt und weitere 18-24 h bei 65°C inkubiert. Die Filter (Gele) wurden schließlich 2x 10 min in 2xSSC bei RT, 2x 30 min in 2xSSC/0.2 % SDS bei 60-65°C und eventuell 2x 10 min in 0.1xSSC

bei RT gewaschen. Die noch feuchten Filter wurden in einen Plastikbeutel eingeschweißt und mit einem Röntgenfilm und einer Verstärkerfolie bei -70°C ein bis mehrere Tage exponiert.

14. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA erfolgte nach der Methode von Chen und Seeburg (1985). Hierbei wurden ca. 2-3 µg überwiegend 'supercoiled' Plasmid-DNA (1 pmol) in 32 µl H₂O mit 4 µl 2 N NaOH und 4 µl 2 mM EDTA versetzt und 5 min bei Raumtemperatur denaturiert. Nach Zugabe von 4 µl 2 M Ammoniumacetat/pH 4.5 und 88 µl Ethanol wurde die DNA gefällt (15 min bei -70°C). Dann wurde 15 min zentrifugiert (4°C, Eppendorffzentrifuge) und mit 80 % Ethanol gewaschen. Zu dem getrockneten Pellet wurden 1.5 µl 10x Annealing-Puffer (70 mM Tris-HCl/pH 5.5, 70 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA), 1 µl Sequenzierungsprimer (1 pmol/µl), 1.6 µl α-[³²S]dATP und 10 µl H₂O pipettiert. Der Ansatz wurde 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 4 µl Klenow-Fragment (0.5 U/µl in 1x Annealing-Puffer) zu der Lösung gegeben und gemischt, jeweils 4 µl auf vier Eppendorffgefäße mit je 2 µl der basenspezifischen Reaktionsmischungen verteilt. Diese Mischungen enthielten die, in der Tabelle aufgeführten, Nukleotidkonzentrationen. Die Reaktion erfolgte zunächst 20 min bei 37°C, nach Zugabe von 1 µl Chase-Mix (je 500 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) wurden die Reaktion weitere 15 min bei der gleichen Temperatur inkubiert. Die Proben wurden im Exsikkator getrocknet und in 3 µl Auftragspuffer (98% deionisiertes Formamid, 10 mM EDTA, 0.2% Bromphenolblau, 0.2% Xylencyanol) aufgenommen.

Basenspezifische Mischungen (in 1x Annealingpuffer):

Nukleotid (µM)	A-Mix	C-Mix	G-Mix	T-Mix
dCTP	100	10	100	100
dGTP	100	100	5	100
dTTT	100	100	100	5
ddATP	100	-	-	-
ddCTP	-	100	-	-
ddGTP	-	-	120	-
ddTTP	-	-	-	500

15. Sequenzgele

Nach der Methode von Ansorge und Barker (1984) wurden die Sequenzgele kovalent an eine Glasplatte gebunden und während der Elektrophorese in einer LKB-Makromould-Apparatur thermostatisiert:

Die Thermostatisierplatte wurde mit 2x 7.5 ml "Repel"-Silan (2 % Dichlordimethylsilan in Chloroform) vorbehandelt, die Gelplatte mit "Bind"-Silan (0.3 % in 10 ml Ethanol/0.3 % Essigsäure). Die Gellösung (100 ml) enthielt 42 g Harnstoff (7 M), 4.76 g Acrylamid, 0.24 g Bisacrylamid, 10 ml 10xTBE, 600 µl 10% Ammoniumpersulfat und 60 µl TEMED. Als Laufpuffer wurde 1xTBE eingesetzt.

Während der Präelektrophorese (1500 V) wurde das Gel (meist ein Keilgel von 0.1 mm bis 0.4 mm Dicke) durch die Thermostatisierplatte auf 60-65°C aufgeheizt. Die Sequenzierungsproben wurden 2 min bei 95°C denaturiert und jeweils ca. 1 µl mit einer Glaskapillare in die Geltaschen appliziert. Die Auftrennung der Proben erfolgte dann bei 2000-2500 V (maximal 30 mA). Die Elektrophorese wurde beendet, wenn der Farbstoff Bromphenolblau (der zuletzt aufgetragenen Probe) die Gelgrenze erreicht hatte (nach ca. 1.5 h). Mehrmalige (bis zu drei) Aufträge einer Probe erfolgten im Zeitabstand von 60-80 min. Nach der Elektrophorese wurde das auf der Gelplatte haftende Sequenzgel in 10 % Essigsäure fixiert (15 min), 90 min bei 80°C im Brutschrank oder im warmen Luftstrom eines Föns getrocknet und mit einem Röntgenfilm in einer Kassette bei RT über Nacht exponiert.

16. Computeranalyse

Für Nukleotid- und Proteinvergleiche mit Datenbanken standen die Suchprogramme FastN, bzw. FastP (Lipman & Pearson, 1985) auf der VAX zur Verfügung. Die durchmusterten Datenbanken waren i) NBRF Genbank (National Biomedical Research Foundation, USA), ii) EMBL Genbank (European Molecular Biology Laboratories, Heidelberg), sowie die beiden kombinierten Datenbanken iii) PSeqP und iv) MIPS(Y/X) (F. Pfeiffer, Inst. f. Biochemie, Martinsried, pers. Mitteilung).

Zur weiteren Verarbeitung von DNA- und Proteinsequenzen wurden das PIR-Programm ALIGN (Barker et al., 1983), sowie UWGCG-Programme (Devereux et al., 1984), wie z. B. FOLD (Zuker & Stiegler, 1981) verwendet.

Zur Unterstützung der Verarbeitung der Sequenzdaten auf dem Personalcomputer stand das Programm Microgenie (Beckman) zur Verfügung.

C) ERGEBNISSE UND DISKUSSION

TEIL I: ANALYSE DES GENOMISCHEN rDNA-KLONS pQHC7

1. Einführung

Der genomische Klon pQHC7 wurde aus einer Hefegenbank isoliert, die durch Klonierung, partiell mit dem Restriktionsenzym Sau 3A geschnittener, genomischer DNA in die singuläre Bam HI Schnittstelle des Hefe-*E. coli* Shuttlevektors YEp13 hergestellt worden war (Masmyth & Reed, 1980). Ursprünglich war die Absicht gewesen hämregulierte Gene zu isolieren. Dazu wurden nach einem kompetitiven Hybridisierungsassay potentielle Kandidaten (für den Besitz hämregulierter Gene) zum einen durch kompetitive bzw. differentielle Hybridisierungen, zum anderen durch Hybridisierungen mit Oligonukleotiden, die nach den Nukleotidsequenzen der publizierten UAS-Elemente des CYC1-Gens (Guarente et al., 1984, siehe auch Tab. 1) hergestellt worden waren, nachgereinigt (Magdolen, 1985; Strobel et al., 1988). Zwei der gereinigten Klone (pQHC7, bzw. pQHC5 (Magdolen, 1985)) wurden von R. Schrickler (1986) weiter analysiert. Dabei stellte er unter anderem fest, daß beide Klone annähernd das gleiche ca. 4,8 kb lange Fragment von Hefe-DNA enthalten (pQHC7 ist an einem Ende des Inserts um ca. 100 bp länger), jedoch in unterschiedlicher Orientierung in den Vektor inseriert sind. Weiter konnte der transkribierte Bereich des Klons pQHC7 grob kartiert werden. In der Nähe des 5'-Endes der transkribierten Region wurde der Bereich lokalisiert, der mit UAS_{c1} und UAS_{c2} des Iso-1-Cytochrom c Gens starke Homologien aufweist (Schrickler, 1986; Strobel et al., 1988). Eine Zusammenfassung ist in Abb. 3A und B wiedergegeben. Aufgrund dieser Daten sollte zunächst der Bereich des Klons pQHC7, der mit den synthetisch hergestellten Oligonukleotiden UAS_{c1} und UAS_{c2} hybridisiert und das 5'-Ende des vermuteten Gens enthält, sequenziert werden.

2. Herstellung und Charakterisierung der Subklone pQCC320.

pQCV650 und pQKV450

pQHC7 wurde mit Cla I bzw. in einem Doppelverdau mit Cla I und Pvu II gespalten und das 320 bp Cla I- bzw. 650 bp Cla I/Pvu II-Fragment isoliert (Abb. 3A). Das Cla I 320 bp-Fragment wurde anschließend in den mit Acc I geschnittenen Vektor pUC19 (pQCC320), das Cla I/Pvu II 650 bp-Fragment hingegen in den mit Sma I und Acc I geschnittenen Vektor pUC12 (pQCV650) integriert (Abb. 3C). Im Insert des Klons pQCV650 konnte eine interne Kpn I-Stelle identifiziert werden. Durch Isolierung des Kpn I/Eco RI 450 bp-Fragments (Eco RI spaltet im Polylinkeranteil von pQCV650) und Klonierung in den mit Kpn I- und Eco RI-geschnittenen Vektor pUC 19 (pQKV450), konnte daher das 650 bp Cla I/Pvu II-Fragment um ca. 200 bp von der Cla I-Stelle her verkürzt werden. Mit Hilfe der drei Subklone pQCC320, pQCV650 und pQKV450 wurde die durchgehende Nukleotidsequenz von 941 bp ermittelt (Abb. 3C, D und Abb. 4). Die Zuordnung der Sequenz des Cla I 320 bp-Fragments zu der restlichen Sequenz ist durch die asymmetrisch im Fragment liegenden Eco RI-Schnittstelle festgelegt (Abb. 3A).

Nukleotidsequenzvergleiche mit bereits publizierten Hefesequenzen ergab, daß es sich bei dem Klon pQHC7 um einen Teil des rDNA-Clusters handelt. Wie Abb. 5 zeigt, enthält pQHC7 den 3'-terminalen Bereich ($\approx$ 120 bp) der 18S, die gesamte 5.8 S und 25S rRNA, sowie ungefähr 450 bp der 3'-flankierenden, nicht transkribierten Spacerregion.

Der sequenzierte Bereich enthält das 3'-Ende der 5.8S sowie das 5'-Ende der 25S rRNA (Abb. 4 und 5C). Die Nukleotidsequenz des Klons pQHC7 war identisch mit der für diesen Bereich bereits publizierten Sequenz (Veldman et al., 1981; Rubin, 1977) mit Ausnahme eines zusätzlichen dT-Restes in einem Abschnitt bestehend aus sieben aufeinanderfolgenden dT-Basen (Abb. 4).

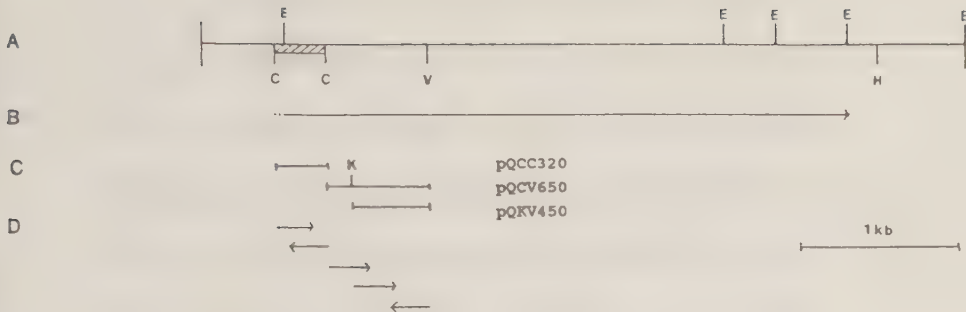


Abb. 3: Charakterisierung des genomischen Klons pQHC7.

A) Grobe Restriktionskarte des Hefe-Insertfragments des Klons pQHC7. Das Cla I 320 bp-Fragment, das mit UASc1 bzw. UASc2 kreuzhybridisiert, ist durch das schraffierte Rechteck angedeutet. C, Cla I; E, Eco RI; H, Hind III; V, Pvu II. B) Transkribierter Bereich des Klons pQHC7; die Transkriptionsrichtung ist durch den Pfeil angedeutet. C) Lage der Subklone, die für die Nukleotidsequenzanalyse verwendet wurden. Die interne Kpn I-Schnittstelle des Klons pQCV650, die für die Konstruktion des Klons pQKV450 benutzt wurde, ist mit K gekennzeichnet. D) Sequenzierungsstrategie; Richtung und Länge der ermittelten Sequenzen sind durch Pfeile angedeutet.

In *S. cerevisiae* bilden die Gene der 4 rRNA-Arten (18S, 5.8S, 25S und 5S rRNA) eine Wiederholungseinheit, die ungefähr 9100 bp lang ist. Pro haploidem Genom existieren mehr als 100 rRNA-Genkopien, die auf Chromosom XII lokalisiert sind (Petes, 1980). Der größte Teil des rDNA-Clusters in Hefe ist sequenziert, die Lage und der Aufbau der gebildeten Transkripte gut analysiert (Warner, 1982). Eines der Transkripte, die 5S rRNA, wird von der Polymerase III gebildet und wahrscheinlich nicht weiter prozessiert. Das andere Transkript, vom entgegen-

Cl_a I Eco RI 60
 ATCGATGAAG AACCCAGCGA AATGCGATAC GTAATGTGAA TTGCAGAA^{TT} CCGTGAATCA
Sph I 120
 TCGAATCTTT GAACGCACAT TCGGCCCTT GGTATTCAG GGGGCATGCC TGT^{TT}TGAGCG
 ..CAUUU^{OH} 180
 TCATTTCTT CTCAAA^{CA}ATT CTGTTTGGTA GTGAGTGATA CTCTTTGGAG TTA^{ACT}TGAA
240
 ATTGCTGGCC TTTTCATTGG ATGTTTTTTT TTCCAAAGAG AGGTTTCTCT GCGTGTGTA
300
 GGTATAATGC AAGTACGGTC GTTTTAGGTT TTACCAACTG CGGCTAA^{CT}T TTTT^{TA}TATAC
Cl_a I 360
 TGACGTATT GGAACGTTAT CGATAAGAAG AGAGCGTCTA GCGCAACA^{AT} GTTCTTAAAG
 5'-UUGAG... 420
 TTTGACCTCA AATCAGGTAG GAGTACCGCG TGAAC^{TT}TAAG CATATCAATA AGCGGAGGAA
480
AAGAAACCAA CGGGGATTGC CTTAGTAACG GCGAGTGAAG CGGCAAAAGC TCAAATTTGA
Kpn I 540
AATCTGGTAG CTTCGGTGCC CGAGTTGTAA TTTGGAGAGG GCAACTTTGG GGCCGTTCTT
600
 TGTCTATGTT CCTTGGAAACA GGACGTCATA GAGGGTGAGA ATCCCGTGTG GCGAGGAGTG
660
 CGGTCTTTG TAAAGTGCCT TCGAAGAGTC GAGTTGTTTG GGAATGCAGC TCTAAGTGGG
720
 TGGTAAATTC CATCTAAAGC TAAATATTGG CGAGAGACCG ATAGCGAACA AGTACAGTGA
780
 TGGAAAGATG AAAAGAACTT TGA^{AA}AGAGA GTGAAAAAGT ACGTGA^{AA}TT GTTGAAAGGG
840
 AAGGGCATTG GATCAGACAT GGTGTTTTGT GCCCTCTGCT CCTTGTGGGT AGGGGAATCT
900
 CGCATTTTAC TGGGCCAGCA TCAGTTTTGG TGGCAGGATA AATCCATAGG AATGTAGCTT
Pvu II
 GCCTCGGTAA GTATTATAGC CTGTGGGAAT ACTGCCAGCT G

Abb. 4: DNA-Sequenz des analysierten Bereiches von pQHC7.
 Das 5'-Ende der 25S rRNA sowie das 3'-Ende der 5.8S rRNA sind angegeben. Das eingerahmte T bei Pos. 296 ist eine zusätzliche, im Vergleich mit den publizierten rDNA-Sequenzen gefundene, Base (Veldman et al., 1981). Das 104 bp Rsa I-Fragment, das für die Fragmentelongation verwendet wurde, um die 5'-Enden der 25S rRNA Transkripte festzulegen, ist unterstrichen. Die wichtigsten Restriktionsstellen sind oberhalb der Sequenz angedeutet.

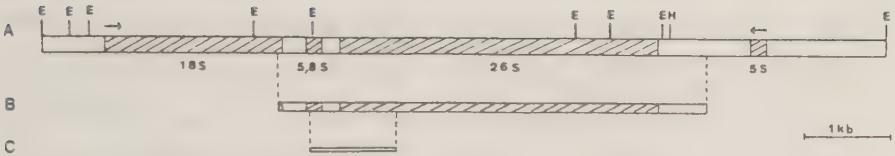


Abb. 5: Vergleich der rDNA-Wiederholungseinheit mit pQHC7

A) Die Struktur der rRNA-Gene in Hefe ist dargestellt. Die schraffierten Blöcke stellen die codierenden Bereiche dar. Die Transkriptionsrichtung der 37S bzw. 5S rRNAs ist mit Pfeilen angedeutet. E, Eco RI; H, Hind III B) Insertfragment des Klon pQHC7 C) Lage des sequenzierten Bereiches des Klon pQHC7

gesetzten Strang gelesen, wird durch die Polymerase I synthetisiert. Es entsteht ein Primärtranskript (37S rRNA), das in mehreren Schritten zu den 18S, 5.8S und 25S rRNAs prozessiert wird. Die gesamte Wiederholungseinheit, also auch die nicht-transkribierten intergenischen Regionen, sowie die nicht-codierenden transkribierten Spacer, ist hoch konserviert (Warner, 1982; Schricker, 1986; eigene unveröffentlichte Ergebnisse).

Die Hybridisierung der Oligonukleotide UASc1 und UASc2 mit dem 320 bp Cla I-Fragment beruhte auf einer signifikanten Homologie zu zwei kurzen DNA-Abschnitten oberhalb der codierenden Region der 25S rRNA. Die Position der zu den UAS-Elementen des CYC1-Gens homologen Region ist in Abbildung 8 gezeigt. Tabelle 1 hingegen vergleicht die Sequenzen mit den vermuteten UAS-Regionen anderer Häm-kontrollierter Gene, wie Iso-1-Cytochrom c (Guarente et al., 1984), Katalase T (Spevak et al., 1986), Mangan-abhängige Superoxid Dismutase (Marres

	UAS1:	UAS2:
CYC1:	CTCTTTGGCCGGGG-----TTTAC	CTCATT ^A TT--GGCG--AGCGTTGG--TT
SOD:	CTC-TTGGCGgtctatcctaTTTgC	aTCATTg ^A ttGGCGcgAcC-TTaAaccT
CTT1:	CTCTcctGCgtGet-----TTcAC	CTC-TTT--ttCa--AGgGgatcaccg
CYC3:	CTC-TTGcgCGGcG-----Tggga	CTC-TTT--t ^A tta--togacTtt--TT
CYB:	aTtaTTGGtCGGGtcgtagTTctC	tTC--TT--GGCG--gttcTTGt--aT
QEC7:	aTCTTTGaaCGcac-----aTTgC	CTC-TTT--GGaGttAaC-TTGAAaTT

Tab. 1: Vergleich der vermuteten Hämkontroll-Regionen

Die UAS-Sequenzen stammen aus folgenden Arbeiten: CYC1 (Iso-1-Cytochrom c (Guarente et al., 1984); SOD (Mangan-abh. Superoxid-Dismutase) (Marres et al., 1985); CTT1 (Katalase I) (Spevak et al., 1986); CYB (Cytochrom b₂) (Guiard, 1985); CYC3 (Cytochrom c:Hämlyase) (Dumont et al., 1987); QHC7 (rDNA, diese Arbeit). Großbuchstaben kennzeichnen identische Basen mit den UAS-Sequenzen des CYC1-Gens. Die G → A 'Upshift'-Mutation in UASc2 (Guarente & Mason, 1983) ist in den synthetisch hergestellten Oligonukleotiden, die mit dem Cla I 320 bp-Fragment hybridisieren, ebenfalls enthalten (Strobel et al., 1988).

et al., 1985), Cytochrom b₂ (Guiard, 1985) und Hämlyase (Dumont et al., 1987).

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die Homologie der rDNA-Sequenzen zu UASc1 bzw. UASc2 ähnlich ausgeprägt ist wie die der vermuteten regulatorischen Elemente anderer Gene. Stromab der zwei UAS-ähnlichen Sequenzabschnitten und oberhalb des 5'-Endes der 25S rRNA konnte zudem ein TATA-ähnliches Element (TATAAT, Abb.8) lokalisiert werden.

3. Konstruktion von rDNA/lacZ-Fusionsgenen

Aufgrund des Auftretens zweier UAS-ähnlicher Elemente - gefolgt von einer *bona fide* TATA-Box - in der Region oberhalb des 25S rRNA-Gens, war es reizvoll zu prüfen, ob dieser DNA-Abschnitt eine Polymerase II-Affinität besitzt. Die promoterähnliche Struktur stellte kein natürliches AUG-Startcodon für die Promoter/lacZ-Fusion bereit; der benutzte Klonierungsvektor pMC1871 (Abb. 6) trägt annähernd das vollständige lacZ-Gen jedoch mit Ausnahme der ersten 8 N-terminalen Aminosäuren (Casadaban et al., 1983). Es mußte daher eine Strategie entwickelt werden, um bei der Fusion des promoterähnlichen Fragments an das lacZ-Gen aus *E. coli* ein Startcodon für den Leserahmen der β -Galaktosidase zu generieren.

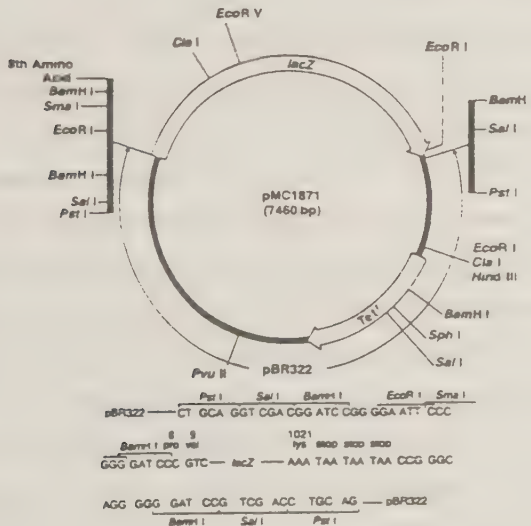


Abb. 6: Aufbau des Vektors pMC1871.

Die Polylinkerregionen am N- und C-Terminus des lacZ-Gens sind hervorgehoben und typische Restriktionsstellen des lacZ-Gen- bzw. pBR322-Anteils angegeben (aus: Katalog der Fa. Pharmacia, 1987).

Ausgangspunkt war Klon pQCC320 (Abb. 3C), der das Cla I-Fragment in der Acc I-Stelle von pUC19 trägt; die interne Eco RI-, bzw. Sph I-Erkennungsstelle (Abb. 4) liegt in pQCC320 distal zur Sph I-Stelle der Polylinkerregion. pQCC320 wurde mit Sma I und partiell mit Sph I verdaut und das 350 bp 'Promoterfragment' mit der intakten, internen Sph I-Stelle isoliert. Das 3'-überhängende Ende der Sph I-Stelle wurde mit einem dazu komplementären, synthetisch hergestellten Tetranukleotid (5' CATG 3') aufgefüllt, wobei ein terminales ATG-Triplett erzeugt wurde, und anschließend in die singuläre Sma I-Klonierungsstelle des Vektors pMC1871 stumpfendig ligiert. Durch einen Restriktionsverdau mit Bam HI, das je eine Erkennungsstelle unmittelbar vor und nach der Sma I-Klonierungsstelle im pMC1871 besitzt (Abb. 6), wurde auf eine erfolgreiche Insertion des 'Promoterfragments' geprüft.

Die Insertion des 'Promoterfragments' in der richtigen Orientierung (Abb. 8) - also die Fusion der aufgefüllten Sph I-Stelle 'in frame' zum lacZ-Gen - wurde auf verschiedener Weise geprüft: i) Die Klone, die das Fragment in der gewünschten Orientierung enthielten (pMCP300i), bildeten bei Wachstum in Gegenwart von XGal blaue Kolonien, während pMC1871 bzw. das Konstrukt mit der anderen möglichen Orientierung (pMCP300a) XGal nicht spalten konnten. Dies war gleichzeitig der erste Hinweis darauf, daß das 'Promoterfragment' zumindest in *E. coli* als Promoter erkannt wird. ii) Bei der Klonierung des 'Promoterfragments' in die Sma I-Schnittstelle wird an einem Ende eine Sma I-Stelle rekonstituiert. Es wurde gezeigt, daß in den Plasmiden der Kolonien, die XGal spalten konnten, die rekonstituierte Sma I-Stelle distal zum lacZ-Gen lagen. iii) Die 'in frame'-Fusion des terminalen ATG-Triplets mit dem offenen Leserahmen des lacZ-Gens wurde durch Sequenzierung nachgewiesen. Hierbei wurde pMCP300i mit Hilfe des Universal Primers (UP), der komplementär zur codierenden Region des lacZ-Gens ist, direkt ohne weitere Subklonierungsschritte sequenziert (nicht gezeigt).

Neben pMCP300i wurde ein Kontrollplasmid konstruiert, das das lacZ-Gen mit einem ATG-Startcodon, aber nicht den 'Testpromoter' enthält ('ATGlacZ'). Hierbei wurde der Umstand ausgenutzt, daß bei der Herstellung von pMCP300i ein kurzer Bereich des Polylinkers von pQCC320 mitkloniert wurde: dieser enthält zwischen der Acc I/Cla I-Insertionsstelle des 320 bp rDNA-Fragments und der aufgefüllten Sph I-Stelle zusätzlich eine Pst I-Erkennungssequenz (Abb. 7). pMCP300i wurde mit Pst I gespalten und das 3,1 kb-Fragment, das das lacZ-Gen mit dem ATG-Startcodon enthält, isoliert. Anschließend wurde dieses Fragment in den Vektor pBR322 kloniert und ein Konstrukt durch Restriktionsanalyse selektiert, das das lacZ-Gen in der gleichen Orientierung wie im Vektor pMC187i inseriert hatte (pMCi). Außerdem wurde ein Plasmid konstruiert, das zwischen dem rDNA/lacZ-Fusionsgen und dem Vektoranteil einen prokaryontischen Terminator der Transkription (des J-Gens des Phagen ϕ X174 (Hayashi et al., 1976, 1983)) einkloniert enthielt (pSBter300i). Hierfür wurde das Sal I 3,4 kb-Fragment von pMCP300i, das das Fusionsgen enthält, in den partiell mit Sal I gespaltenen Vektor pSB6 (Bläsi et al., 1988) kloniert und ein Konstrukt durch Restriktionsanalyse selektiert, in dem der 'Testpromoter' dem Transkriptions-terminator unmittelbar folgt (Abb. 7).

Um etwaige β -Galaktosidase-Expression des Fusionsgens in Hefe testen zu können, wurden die rDNA/lacZ-Fusion, bzw. das promoterlose ATGlacZ-Gen in den Hefe-*E. coli* Shuttlevektor YEp13 (Abb. 17) kloniert. Zur Herstellung des Klons YEp300lacZ wurde das rDNA/lacZ-Fusionsgen wiederum mit Sal I aus pMCP300i exzisiert und in eine der beiden Sal I-Schnittstellen des partiell mit Sal I gespaltenen Vektors YEp13 inseriert. Eine Sal I-Stelle ist im Tetrazyklingen des Plasmids lokalisiert. Positive Klone konnten also durch Verlust der Tetrazyklinresistenz selektiert werden.

Die Konstruktion des Hefevektors, das ein promoterloses ATGlacZ-Gen enthält, konnte nicht in einem Schritt erfolgen. Zunächst mußte das Pst I-Fragment von pMCP300i (s.o.), das das ATGlacZ-Gen enthält, in pUC19 kloniert werden

(pUClacZATG). Theoretisch sind zwei Orientierungen der Insertion des Fragments möglich; dennoch wurden nur Klone in der Orientierung gefunden, in der das 5'-Ende des ATGlacZ-Gens dem lacZ-Promoter des Vektors pUC19 folgt. Diese Klone exprimieren eine funktionelle β -Galaktosidase, die Expression ist IPTG-abhängig (nicht gezeigt). Korrekte Insertionen in der anderen Orientierung wurden bei keinem der 24 untersuchten Klonen beobachtet. Ein Grund hierfür könnte sein, daß in dieser Orientierung ein ca. 800 bp 'inverted repeat' gebildet werden kann, das aus der DNA-Sequenz von pUC19, das für das α -Fragment der β -Galaktosidase codiert und der identischen Sequenz des lacZ-Gens besteht und daher möglicherweise instabil ist. Bei Insertion in der anderen Richtung liegen die beiden identischen Sequenzen mehr als 2,5 kb voneinander getrennt vor. pUClacZATG wurde mit Sal I und Sph I gespalten, das Sal I/Sph I 3,1 kb-Fragment, das das ATGlacZ-Gen enthält, isoliert und in den Vektor YEp13, der mit Sph I sowie partiell mit Sal I gespalten war, inseriert (YEpilacZ). Die Selektion auf positive Klone erfolgte wiederum über Verlust der Tetrazyklin-resistenz. Das lacZ-Gen liegt bei YEp300ilacZ in der gleichen Orientierung relativ zum Vektor wie bei YEpilacZ vor. Die Konstruktion der rDNA/lacZ-Fusionsgene, bzw. der Kontrollplasmide ist in Abbildung 7 zusammengefaßt.

4. Test der β -Galaktosidase-Expression der rDNA/lacZ-Fusionsgene in Hefe

G. Strobel konnte durch Messungen der resultierenden β -Galaktosidase-aktivitäten der konstruierten rDNA/lacZ-Fusionsgene, bzw. der Kontrollen nach Transformation der entsprechenden Plasmide in einen *E. coli*-Stamm, der selbst keinerlei lacZ-Sequenzen enthielt (JM109^W(lac^o)), nachweisen, daß das promoter-ähnliche Hefefragment in *E. coli* als (ein relativ schwacher) Promoter zu wirken vermag. Während weder pMC1871, noch pNCi oder YEpilacZ eine signifikante β -Galaktosidaseaktivität offenbarten, konnte eine deutliche (IPTG-unabhängige)

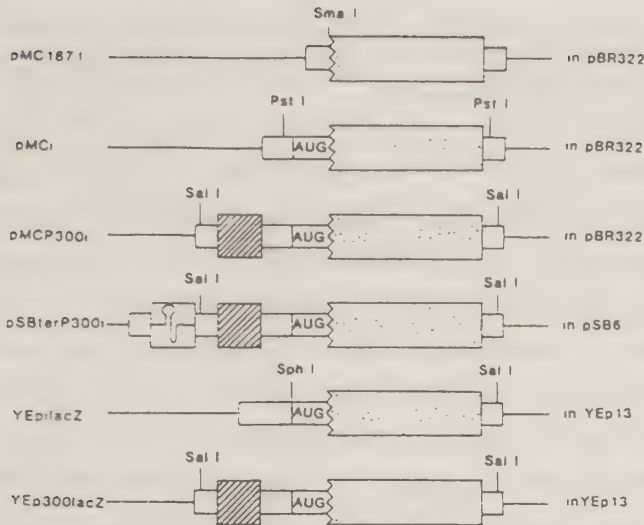


Abb. 7: Schematische Darstellung der Konstrukte, die zur Untersuchung der lacZ-Expression unter der Kontrolle des 320 bp rDNA-Fragments verwendet wurden.

Einfache Linie, Vektoranteil (pBR322, pUR222, YEpl3); offenes Rechteck, Polylinkersequenzen mit Startcodon ATG; punktiertes Rechteck, codierende Sequenz des lacZ-Gens (die ersten 8 N-terminalen Aminosäuren fehlen); schraffierter Block, 320 bp Cla I 'Promoterfragment' aus der 5'-oberhalb des 25S rRNA-Gens liegenden Region; Block mit angeedeuteter doppelter Haarnadel-Struktur, Transkriptionsterminator des J-Gens des Phagen ØX174. Die zur Herstellung der Klone benutzten Restriktionsschnittstellen sind gekennzeichnet.

Expression der β -Galaktosidase in den Stämmen mit den Plasmiden pMCP300i und YEp300lacZ, die den 'Testpromoter' in der richtigen Orientierung vor dem lacZ-Gen fusioniert enthalten, gemessen werden. Die Insertion des prokaryontischen Transkriptionsterminators vor dem Testpromoter (pSBterP300i) führt nicht zu einer deutlichen Verminderung der β -Galaktosidase-Expression (Strobel et al., 1988).

Die Expression der β -Galaktosidase der rDNA/lacZ-Fusions- und Kontrollplasmide wurde auch in Hefe getestet. Die verschiedenen Plasmide wurden in zwei Hefe-

Empfängerstämme transformiert, zum einen in den atmungskompetenten Stamm AH215, zum anderen in den, in der δ -ALA-Synthetase defizienten Stamm TO2 (Strobel et al., 1988). Die Selektion der Transformanten erfolgte durch Komplementation des leu2-Defekts beider Stämme durch das LEU2⁺-Gen, das auf dem Vektoranteil von YEpl3 codiert ist. Die gelungene Transformation der Plasmide in Hefe wurde durch Reisolierung, Rücktransformation in den *E. coli*-Wirt SF8 und Restriktionsanalyse überprüft. Zudem wurde durch mehrtägiges Wachstum der Transformanten auf leucinhaltigem Medium und anschließendes Ausplattieren auf leucinfreien Platten gezeigt, daß es sich bei dem LEU⁺-Phänotyp um plasmidcodierte Komplementation handelt: ein Großteil der Transformanten verliert im Laufe der Zeit unter nicht-selektiven Bedingungen spontan das Plasmid und somit die Fähigkeit, auf leucinfreiem Medium zu wachsen. In beiden Stämmen konnte eine signifikante β -Galaktosidaseaktivität von YEpl300lacZ nachgewiesen werden. Keine Expression konnte hingegen bei den Kontrollplasmiden YEpl3 bzw. YEpilacZ festgestellt werden (Tab. 2).

Aufgrund des Auftretens der zwei UASc-ähnlichen Elemente in dem rDNA-Fragment, das die Transkription des lacZ-Gens bewirkt, wurde getestet, ob die Expression in Hefe hämabhängig erfolgt. Hierfür wurden die LEU⁺-Transformanten des Empfängerstamms TO2 zum einen unter hämfreien Bedingungen gezüchtet. Andererseits wurde durch Zugabe von δ -ALA, bzw. DIX die Häm-abhängige Transkription induziert (Schmalix et al., 1986). Wie Tabelle 2 zeigt, ist die β -Galaktosidaseaktivität unter den verschiedenen Bedingungen annähernd gleich. Die UASc-ähnlichen Sequenzen scheinen keine hämabhängige Aktivierung der Transkription zu vermitteln.

Die relativ geringe Expression der β -Galaktosidase in Hefe kann - wenigstens zum Teil - darauf zurückgeführt werden, daß die Umgebung des ATG-Startcodons artifiziell ist und stark von der Konsensussequenz abweicht (Tab. 9), die für Hefe vorgeschlagen wird (Dobson et al., 1982; Hamilton et al., 1987).

Hefe- stamm	Plasmid	Test- prom.	β -Gal-Aktivität		
			-Ind	+ALA	+DIX
AH215	-		0	nt	nt
AH215	YEpl3		0	nt	nt
AH215	YEpilacZ	-	0	nt	nt
AH215	YEp300lacZ	+	0.5	nt	nt
TO2 hem1	YEpilacZ	-	0	0	0
TO2 hem1	YEp300lacZ	+	2.0	1.6	1.8

Tab. 2: β -Galaktosidaseaktivitäten der rDNA/lacZ-Fusionsgene, bzw. der Kontrollen in den Hefestämmen AH215 und TO2
 -Ind: Stamm TO2 hem1-1, gezüchtet auf einem semisynthetischen Medium in 2% Galaktose in Abwesenheit von δ -ALA bzw. DIX; +ALA, +DIX: Die Durchführung des Tests erfolgte 4 h nach Supplementation der Zellen mit 50 μ g/ml δ -Aminolävulinat, bzw. 10 μ M Deuteroporphyrin IX; nt: nicht getestet. Die gemessene β -Galaktosidaseaktivität (Guarente and Ptashne, 1981) ist in nmol o-Nitrophenol x min⁻¹ x mg⁻¹ angegeben. Die Konstrukte sind in Abbildung 7 erklärt.

5. Bestimmung der 5'-Enden der gebildeten Transkripte der rDNA/lacZ-Fusionsgene in *E. coli* und Hefe, sowie der 25S rRNA in Hefe

Die Untersuchung der β -Galaktosidaseexpression der Transformanten, die Plasmide mit dem Testpromoter vor dem lacZ-Gen enthielten, zeigte, daß das rDNA-Fragment sowohl in *E. coli* als auch in Hefe eine Promoteraktivität aufweist. Von beträchtlichem Interesse war nunmehr festzustellen, ob die Initiation der Transkription in diesen Fusionsgenen an einer spezifischen Stelle erfolgt und ob die gleiche Promoterstruktur die Initiation in *E. coli* und Hefe bewirkt.

Eco RI

↓

1 AATTCCGTGA ATCATCGAAT CITTTGAACGC ACATTGCGCC CCTTGGTATT

51 CCAGGGGGCA TGCCTGTTTG AGCGTCATTT CTTTCTCAAA CATTCTGTTT
...UCAUUU_{OH}

101 GGTAGTGA GTATCTCTTT GGAGTAACT TGAAATTGCT GGCCTTTTCA

151 TTGGATGTTT TTTTTTCAA AGAGAGGTTT CTCTGCGTGC TTGAGGTATA
-35 -35 -10

201 ATGCAAGTAC GGTCGTTTGA GGTTTTACCA ACTGCGGCTA ATCTTTTTTT
E -10 S.D. E
* * *

251 ATACTGACCG TATTGGAACG TTATGacct gcaggg atg GGG GAT CCC GTC GTT TTA CAA CGT CGT GAC TGG GAA
S.D. S.D. Cla I
↓
* Tgcacct g Met Gly Asp Pro Val Val Leu Gln Arg Arg Asp Trp Glu
*
Y ACC I

Abb. 8: Sequenz des rDNA/lacZ-Fusionsgenübergangs

Großbuchstaben: Sequenz des Eco RI/ Cla I rDNA-Fragments mit den UASc-ähnlichen Elementen (unterstrichen); Kleinbuchstaben: Polylinkersequenzen mit ATG (aus pUC19); Kursiv: codierende Sequenzen des lacZ-Gens (aus pMC1871). Die Sequenzen, die in *E. coli* wahrscheinlich die Expression des lacZ-Gens bewirken (-35 Regionen, Pribnow-Boxen (-10), sowie *bona fide* Shine Dalgarno Sequenzen (S.D.)), sind oberhalb der DNA-Sequenz angegeben. Das, wahrscheinlich, in Hefe wirkende TATA-Element ist unterstrichen. Die Transkriptionsstartpunkte in *E. coli* sind mit E gekennzeichnet, die singuläre Initiationsstelle in Hefe mit Y. Das 3'-Ende der 5.8S rRNA (Veldmann et al., 1981), sowie die Bindungsstelle des Universal Primers an die codierende Sequenz des lacZ-Gens sind angedeutet.

Zu diesem Zweck wurde RNA aus dem *E. coli* Stamm JM109W(lac^G), der mit dem Fusionsplasmid pMCP3001 transformiert war, bzw. RNA aus Hefe (AH215) - mit YEp300lacZ transformiert -, isoliert. Die Bestimmung der 5'-Enden der von den Fusionsgenen gebildeten Transkripte erfolgte durch Primerelongation nach Hybridisierung des Universal Primers an die entsprechende codierende Sequenz der lacZ-mRNA (Abb. 8). Abbildung 9 zeigt, daß sowohl in *E. coli* als auch in Hefe eine spezifische Initiation der Transkription im untersuchten rDNA-Fragment auftritt.

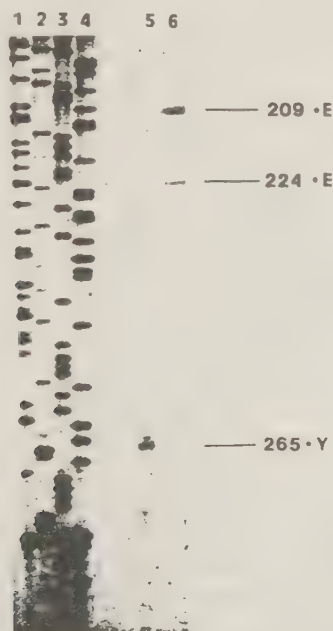


Abb. 9: Primerelongation der, von den rDNA/lacZ-Fusionsgenen, synthetisierten Transkripte in Hefe und *E. coli*. Spuren 1-4, Sequenzleiter einer bekannten Nukleotidsequenz als Größenstandard [Die Sequenzierung erfolgte mit UP]; Spur 5, Universal Primer [UP] wurde gegen Hefe-RNA hybridisiert und elongiert; Spur 6, Elongation des an *E. coli*-RNA hybridisierten Primers. Der Hefe-, bzw. *E. coli*-Stamm, der zur RNA-Isolierung herangezogen wurde, enthielt das rDNA/lacZ-Fusionsplasmid YEp300lacZ, bzw. pMCP3001. Die 5'-Enden der Transkripte sind mit Y (Hefe), bzw. E (*E. coli*) gekennzeichnet. Die Positionen der Initiationsstellen (siehe Abb. 8) sind ebenfalls angegeben.

In Hefe ist die singuläre Initiationsstelle 63 bp 3' unterhalb des TATA-ähnlichen Elements lokalisiert (Abb. 8 und 9). Der Abstand zwischen der TATA-Box und der Initiation der Transkription gehorcht damit den für Hefe aufgestellten Konsensusregeln (Struhl, 1987). In *E. coli* konnte dagegen festgestellt werden, daß zwei Transkripte gebildet werden. Die Initiationsstellen sind 15 bp voneinander entfernt. Dies bedeutet aber, daß diese zwei Transkripte von zwei überlappenden Promotoren auf dem gleichen DNA-Strang initiiert werden (Abb. 8 und 9). Multiple Promoterstrukturen zur Transkription eines Gens bzw. Operons treten in *E. coli* sehr selten auf. Ein gut untersuchtes Beispiel ist jedoch die Promoterregion des Gal-Operons (Musso et al., 1977).

Die Analyse der Region 5'-oberhalb der Initiationsstellen in *E. coli* macht wahrscheinlich, daß die Goldberg-Hogness Sequenz TATAATG (Pos. 197-203, Abb. 8), die augenscheinlich in Hefe als TATA-Element wirkt, in *E. coli* ebenfalls benutzt wird. Dieses konservierte Sequenzelement (Hawley & McClure, 1983; Bucher & Trifonov, 1986) tritt 7 bp 5'-oberhalb der Initiationsstelle des längeren Transkripts, das mit einem A-Rest beginnt, auf. Als -35 Region dieser Promoterstruktur muß die 12 bp entfernte Sequenz TTCTCT angesehen werden. Der relativ kurze Abstand und die dürftige Übereinstimmung zum Konsensus TTGACa (Bucher & Trifonov, 1986) erklärt, warum dieser Promoter trotz der idealen Pribnow-Box in *E. coli* relativ schwach ist. Die Initiationsstelle des kürzeren Transkripts liegt 6 bp 3'-unterhalb der Sequenz TCGTTT, die eine geringe Homologie zur Konsensussequenz der Pribnow-Box aufweist. Im optimalen Abstand (16 bp) dazu befindet sich jedoch eine fast perfekte -35 Region (TTGAGG). Das 5'-Ende des kürzeren Transkripts fällt mit einem T-Rest zusammen. Dieser Umstand und die schwach ausgeprägte Homologie zur Pribnow-Box führt wahrscheinlich dazu, daß dieser Promoter ebenfalls nicht effiziente Transkriptionsinitiation in *E. coli* bewirkt. Zudem kann die Tatsache, daß beide Promoterstrukturen sich gegenseitig partiell überlappen, zu einer zusätzlichen Reduktion der Promoteraktivitäten führen. In den gebildeten Transkripten sind

mehrere potentielle Ribosomenbindungsstellen (Shine Dalgarno Sequenzen) vorhanden (Abb. 8). Die Sequenz AGGU (Pos. 219-222) ist z. B. im Leader der RNA des R17 A-Proteins Teil der Ribosomenbindungsstelle. Die Motive GGU bzw. AGG, die in der Sequenz AGGU enthalten sind, treten in den Transkripten mehrerer Phagen- und *E. coli*-Transkripte auf und tragen zu den Wechselwirkungen zwischen mRNA und Ribosomen bei (Godson et al., 1987; Jukes, 1978). Das ATG-Triplett, das den N-Terminus des lacZ-Gens codiert, ist das erste 3'-unterhalb der Initiationsstellen gelegene ATG-Codon.

Die rDNA/lacZ-Fusionsversuche zeigten, daß die Transkriptionssysteme in Hefe die rDNA-Sequenz als Promoter erkennen können und spezifisch initiieren. Folglich wurde untersucht, ob der intergenische Bereich zwischen der 5.8S und 25S rRNA auch *in vivo* als Pol II Promoter wirkt. Hierfür wurde Gesamt-RNA, die aus dem Hefewildtyp AH215, bzw. dem Stamm DczH1-1B hem1-1 isoliert worden war, gegen ein 104 bp 25S rDNA-Fragment hybridisiert und - analog der 5'-Endenbestimmung der Transkripte der rDNA/lacZ-Fusionsgene - mit Reverser Transkriptase elongiert. Das 104 bp Rsa I-Fragment enthält ausschließlich codierende Sequenzen des 25S rRNA-Gens (Abb. 4) und beginnt 23 bp unterhalb des 5'-Endes der 25S rRNA (Veldman et al. 1981).

Nach Denaturierung des Fragments und Renaturierung in Gegenwart der Gesamt-RNA unter Bedingungen, die die Ausbildung von RNA-DNA- gegenüber DNA-DNA-Hybriden bevorzugen, bilden sich solche RNA-DNA-Hybride aus, die den 104 bp-Anteil in der RNA enthalten. Neben der 25S rRNA sollten auch solche Transkripte abgefangen werden, deren Initiationsstellen im intergenischen Bereich zwischen den 5.8S und 25S rRNA-Genen lokalisiert sind. Nach Verlängerung des DNA-Primers mit Hilfe der Reversen Transkriptase können die 5'-Enden identifiziert werden.

Bei Durchführung dieses Experiments mit RNA aus dem Hefewildtyp ist neben den 5'-Enden der 25S rRNA eine schwache Bande zu erkennen (Abb. 10), die der identifizierten Initiationsstelle der rDNA/lacZ-Fusion entspricht (oder

zumindest ihr sehr nahe liegt). Entsprechende Versuche mit RNA, die aus hämfrei gewachsenen, bzw. 4 h vor der Präparation mit DIX induzierten Zellen des Stammes DczH1-1B ham1-1, isoliert wurde, zeigten keinen signifikanten Einfluß auf die Intensität dieser Bande (nicht gezeigt). Die Initiationsstelle im intergenischen Bereich liegt ca. 53 bp oberhalb der von Veldman et al. (1981) bestimmten 5'-Prozessierungsstelle der 25S rRNA.

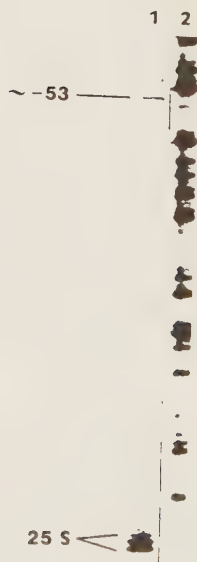


Abb. 10: Fragmentelongation zur Festlegung der 5'-Enden der Transkripte, die *in vivo* im intergenischen Bereich zwischen den 5.8S und 25S rDNA-Genen im Hefewildtyp initiiert werden. Spur 1, 104 bp Rsa I-Fragment, hybridisiert gegen Gesamt-RNA aus Hefewildtyp und elongiert mit Reverser Transkriptase; Spur 2, A-Spur einer bekannten Nukleotidsequenz

Die Fragmentelongation des Rsa I rDNA-Fragments ergab zudem, daß die 5'-Enden der 25S rRNA heterogen sind. In einer längeren Exponierung des Autoradiogramms (nicht gezeigt) treten neben zwei majoren mehrere minore Signale auf, die jeweils um eine Base längere Transkripte widerspiegeln. Die zwei majoren Transkripte wurden bereits von Bayev et al. (1981) beobachtet. Die RNA-Präparation erfolgte in Gegenwart des potenten RNase-Inhibitors Guanidinium-isothiocyanat. Daher scheinen die heterogenen 5'-Enden der 25S rRNA den tatsächlichen Gegebenheiten der RNA-Prozessierung wiederzuspiegeln.

6. Diskussion

Die Assemblierung der Ribosomen wird in Hefe durch die koordinierte Expression der ribosomalen RNAs bzw. Proteine kontrolliert. Der Mechanismus dieser komplexen Regulation ist unbekannt. Es scheint jedoch klar, daß - analog zu *E. coli* - die rRNA-Komponente die Synthese der ribosomalen Proteine reguliert (Warner, 1982; Teem et al., 1984; Leer et al., 1985). Die Anzahl der Ribosomen pro Zelle scheint eng mit der Wachstumsrate gekoppelt zu sein (Valdron & Lacroute, 1975). Die Überführung einer Zellkultur von oxidativem Wachstum (Ethanolmedium) zur Gärung (Glukosemedium) führt z. B. innerhalb von 15 min ungefähr zu einer Verdoppelung der Synthese der Ribosomenkomponenten (Kief & Warner, 1982). Die Supplementierung des in der δ -ALA-Synthetase defizienten Stammes *ole3* mit δ -ALA führt zu einem beträchtlichen Absinken der Generationszeit der Mutante (von ca. 8 h auf 2.5 h (Schmalix et al., 1986)). Die Zunahme der Konzentration der rRNA-Transkripte ist daher nach Zugabe des Hämpräkursors wahrscheinlich, eine mögliche Erklärung für die Isolierung von pQHC7 als potentielltem Kandidaten für den Besitz eines hämregulierten Gens durch den kompetitiven Hybridisierungsassay

Die zwei Haupttranskripte der rDNA-Wiederholungseinheit werden von zwei verschiedenen RNA-Polymerasen synthetisiert: 5S rRNA von Pol III und das 37S

Präkursortranskript von Pol I (Warner, 1982). Das sog. *major*e Promoterelement (MPE) des Pol I-Promoters liegt ungefähr 2 kb 5'-oberhalb der Initiationsstelle der 37S rRNA (also unmittelbar hinter der Terminationsstelle des 37S rRNA-Transkripts der vorhergehenden Wiederholungseinheit). Zwischen MPE und Initiationsstelle befindet sich das 5S rRNA-Gen (Elion & Warner, 1984). Transkriptionsuntersuchungen, die kürzlich an den sogenannten nicht-transkribierten Spacerregionen (NTS) durchgeführt wurden, ergaben Hinweise auf eine mögliche Regulation der Transkription des rDNA-Clusters. Diese Experimente machen wahrscheinlich, daß die RNA Polymerase II 5'-oberhalb der Initiationsstelle der 37S rRNA initiiert und ein (polyadenyliertes) Transkript bildet. Dessen Transkripthäufigkeit hängt von der C-Quelle ab (Parikh et al., 1986, 1987). Zudem wird in ρ^0 -Mutanten (Hefestämme ohne mitochondriales Genom) das polyadenylierte Transkript in weitaus höheren Konzentrationen gefunden als in einem isogenischen mit⁺-Stamm (Atmungsinkompetenz aufgrund einer Mutation im mitochondrialen Genom). Die Konzentrationserhöhung dieser Poly(A)-RNA geht einher mit der Erniedrigung der rRNA-Transkription. Es wird daher angenommen, daß die Transkription an diesem Pol II-Promoter einen Teil eines - noch nicht verstandenen - Mechanismus' darstellt, der die rRNA-Syntheserate feinreguliert (Butow et al., 1988). Diese Untersuchungen deuten jedenfalls darauf hin, daß alle drei RNA-Polymerasen in der rDNA-Wiederholungseinheit Transkripte initiieren.

Die Untersuchung des 5' oberhalb des 25S rRNA-Gens liegenden Region ergab, daß die RNA Pol II an dieser promoterähnlichen Struktur in Hefe *in vivo* initiiert und ein zusätzliches Transkript synthetisiert:

a) Die Fusion des Promoterfragments an das vollständige lacZ-Gen führt zur Expression von β -Galaktosidase in Hefe (und *E. coli*).

b) Primerelongationen zeigen, daß die Initiation der Transkription dieser rDNA/lacZ-Fusionsgene spezifisch - in Hefe an einer singulären, in *E. coli* dagegen an zwei Stellen - erfolgt.

c) In Hefe wird *in vivo* an der entsprechenden Stelle dieser Region ein Transkript initiiert, wie die Fragmentelongation eines 25S rDNA-Fragments, hybridisiert gegen Wildtyp-RNA, zeigt.

Eine Regulation der Transkription durch Häm konnte nicht nachgewiesen werden. Die UAS-ähnlichen Sequenzen im intergenischen Bereich zwischen 5.8S und 25S rRNA (gefunden aufgrund von Sequenzhomologien zu den UAS-Elementen des CYC1-Gens) scheinen keine Bedeutung für die Kontrolle dieses Promoters zu besitzen. Die Homologie zwischen den vermuteten UAS-Elementen anderer hämkontrollierter Gene und UASc1, bzw. UASc2 des CYC1-Gens ist vergleichbar mit der Homologie der UAS-ähnlichen Sequenzen des rDNA-Promoterfragments. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, daß die Bindung des trans-wirkenden Proteins HAP1 bei den Häm-regulierten Genen CYC1, bzw. CYC7 an zwei völlig unterschiedlichen Sequenzen mit etwa gleicher Affinität erfolgt (Pfeifer et al., 1987). Die Erkennung der Bindungsstelle würde also nicht, wie bei den übrigen gut untersuchten Hefe-Regulatorproteinen (z. B. GAL4 oder GCN4) über stark konservierte DNA-Sequenzen, sondern über andere Mechanismen (z. B. DNA-Strukturen, wie A-, B- oder Z-Formen der DNA) erfolgen. Demzufolge sind UAS-Elemente anderer hämregulierter Gene, die lediglich aufgrund von Sequenzhomologien zu den UAS-Elementen des CYC1-Gens identifiziert wurden, in Frage zu stellen. An dem rDNA-Promoterfragment konnte keine hämabhängige Proteinbindung nachgewiesen werden. Das Fragment bindet zwar spezifisch Kernproteine aus Hefe, die Bindung kann aber nicht durch die authentischen UAS-Elemente des CYC1-Gens kompetiert werden (Bandlow, pers. Mitteilung).

Die Funktion der, im intergenischen Bereich der 5.8S und 25S rRNA-Gene initiierten, zusätzlichen RNA ist unklar. Die Transkriptionsuntersuchungen in den MTS-Regionen zeigen jedoch, daß Pol II-Transkripte des rDNA-Clusters eventuell zur Regulation der rDNA-Transkription beitragen. Der hier untersuchte Promoter scheint nicht reguliert zu sein. Die gebildete RNA könnte aber auf post-transkriptionaler Ebene eine Rolle spielen. Prozessierte 25S rRNA kann

nicht zum Aufbau von funktionellen Ribosomen in der Zelle verwendet werden. Zur Assemblierung wird die 37S rRNA, bzw. ein Prozessierungsprodukt davon benötigt. Ein Überschuß maturer 25S rRNA, der von dem untersuchten Promoter erzeugt wird, könnte unter bestimmten Bedingungen die Prozessierung der 37S rRNA, oder die Bildung der 60S Untereinheit beeinflussen. Einen Hinweis darauf, daß die C-Quelle (bzw. die hem1-1-Mutation) die Prozessierung der rRNA beeinträchtigen kann, wurde durch Northern Blot-Analysen erhalten (Bandlow, pers. Mitteilung). Das Signal, das der 37S rRNA entspricht ist - mit der 5.8S rRNA als internem Standard - bei Hybridisierung gegen RNA aus galaktosegewachsenen Zellen (der hem1-1-Mutante) stets stärker als gegen RNA aus laktatgewachsenen Zellen (Strobel et al., 1988).

TEIL II: ANALYSE DES KLONS pUHC3-12

1. Einführung:

U. Oechsner (1986) selektierte mit der prinzipiell gleichen Methode, mit welcher der genomische Klon pQHC7 erhalten worden war (s. I. 1.), zwei weitere Klone (pUHC3-12, bzw. pUHC15-2), die potentielle Kandidatenklone für den Besitz hämregulierter Gens darstellten. Die verwendete Hefegenbank enthielt mit Bam HI gespaltene genomische Hefe-DNA, welche in den Vektor YEpl3 inseriert war. Im Gegensatz zur Genbank, die zur Isolierung des Klons pQHC7 benutzt worden war (partieller Sau 3A-Verdau von genomischer Hefe-DNA), ist die Isolierung von rDNA-Klonen in der Bam HI-Genbank praktisch ausgeschlossen, da die rDNA-Wiederholungseinheit keine interne Bam HI-Schnittstelle besitzt. Die Insertgröße des Klons pUHC3-12 wurde bestimmt (ca. 6 kb), eine Restriktionskarte aufgestellt und der Bereich der klonierten DNA, der in Hefe transkribiert wird, auf ungefähr 2 kb eingeeengt. Eine Zusammenfassung dieser, von U. Oechsner erhaltenen, Ergebnisse ist in Abbildung 11A wiedergegeben. Northern Blot-Analysen, durchgeführt mit dem gesamten Insertfragment, zeigten ein starkes Signal mit einem Transkript von ca. 650 b Länge. Da Northern Blot-Analysen zunächst anzudeuten schienen, daß dieses 650 b-Transkript in Häm-haltigen Zellen, im Vergleich zu hämfrei gewachsenen Zellen, in erhöhten Konzentrationen auftritt (Oechsner, 1986) und damit die Isolierung eines Häm-regulierten Gens implizierte, wurde der transkribierte Bereich von pUHC3-12 näher charakterisiert.

2. Herstellung von Subklonen aus pUHC3-12 und

Identifizierung des Adenylatkinasegens

Das 6 kb Bam HI Insertfragment von pUHC3-12 (YEpl3-Vektoranteil: 10.7 kb) wurde zunächst in den Vektor pUC19 umklont (pUCU3-12, Vektoranteil: 2.7 kb). Aufgrund der Festlegung der transkribierten Region im Insertfragment (Abb. 11A) wurde der entsprechende Bereich subklontiert und näher analysiert. Hierzu wurden jeweils zwei Hind II-, bzw. Hind III-Fragmente isoliert und in pUC-Vektoren inseriert: pADD1501; pADD400; pAAH1400 und pAAH500 (Abb. 11C). Mit Hilfe dieser 4 Klone war der gesamte Bereich des Klon pUHC3-12, von dem nachgewiesen worden war, daß er (mindestens) ein in Hefe transkribiertes Gen enthält, abgedeckt. Da das 500 bp lange Hind III-Fragment noch mit Poly(A)*RNA aus Hefe hybridisiert, wurde zunächst der 'rechte Arm' des klonierten Bereichs sequenziert (Abb. 11C und D). Die Ermittlung der Orientierung der Fragmente zueinander (und damit die Anordnung der Sequenzen) erfolgte zum einen durch die asymmetrisch in den Klonen pADD1501, bzw. pAAH1400 liegenden Hind II-, bzw. Hind III-Stellen, zum anderen dadurch, daß jeder der 4 Klone einen Überlappungsbereich mit mindestens einem anderen Subklon aufweist. Diese grobe Sequenzanalyse ergab tatsächlich einen längeren offenen Leserahmen, dessen abgeleitete Proteinsequenz (s.u.) nahezu identisch mit der für das Adenylatkinaseprotein veröffentlichten war (Tomasselli et al., 1986). Das Gen wurde entsprechend mit AKY bezeichnet. Durch Herstellung weitere Subklone (wie in Abb. 11C und D illustriert) wurde die Nukleotidsequenz auf beiden Strängen und auf überlappenden Fragmenten verifiziert. In Abbildung 12 ist die vollständige Nukleotid- und abgeleitete Proteinsequenz von der Taq I- (Pos. -162) bis zur Hind III-Stelle (Pos. +947) des Adenylatkinase-Gens wiedergegeben.

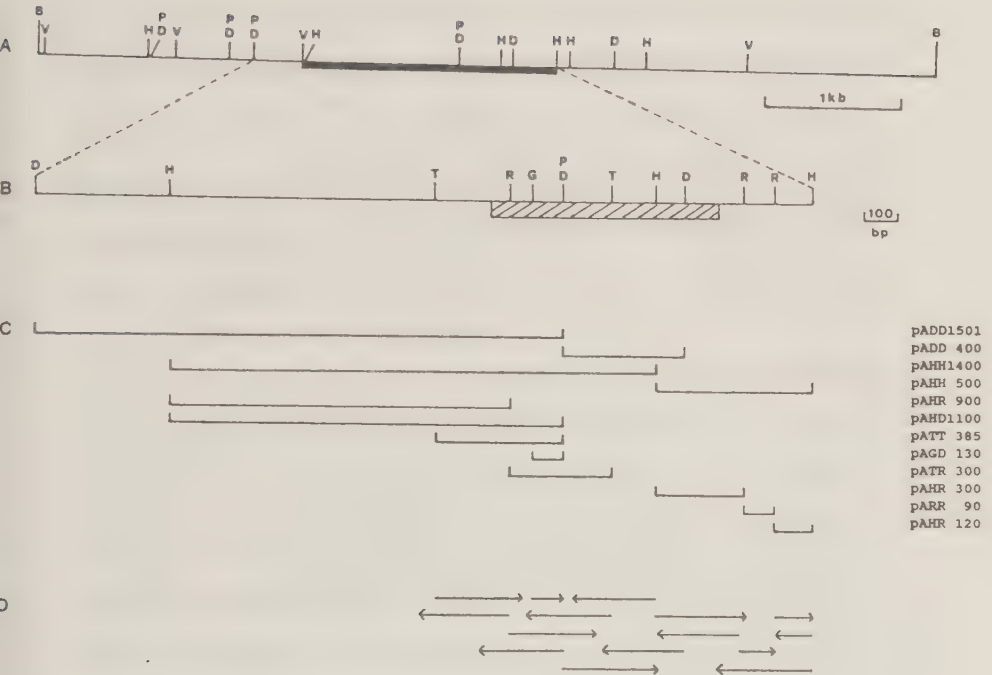


Abb. 11: Restriktionskarte und Sequenzierungsstrategie des genomischen Klon pUHC3-12

A) Grobe Restriktionskarte des 6 kb-Inserts; die hervorgehobene Linie markiert die identifizierten Fragmente, die gegen Poly(A)⁺RNA hybridisieren (Oechsner, 1986). B) 2.25 kb DNA-Region, die das AKY-Gen (schraffierter Block) enthält. Nur Restriktionsschnittstellen, die zum Subklonieren benutzt wurden, sind gezeigt. C) Lage und Größe der hergestellten Subklone zum Sequenzieren des AKY-Gens. D) Sequenzierungsstrategie: Richtung und Länge der durchgeführten Sequenzierungen sind durch Pfeile angedeutet. B, Bam HI; D, Hind II; G, Bgl II; H, Hind III; P, Hpa I; R, Rsa I; T, Taq I; V, Pvu II.

```

-162 TCGACTTTTTCTACTCTGGCTAGTTTTATTACGCATATTTGTATATATATATACGCATAAATTTCTGAAATGGATTACCTGG
-81 TTTATCAGAAACGAGAGCTTTAATAAAGAAACATTAACTGTTTCTCTGGTAAAGTCACACACAGCATCAATATAACAGTA

+1  ATG TCT AGC TCA GAA TCC ATT AGA ATG GTC CTA ATT GGC CCA CCT GGT GCC GGT AAA GGT
   M  S  S  S  E  S  I  R  M  V  L  I  G  P  P  G  A  G  K  G
+61  ACT CAA GCT CCA AAT TTG CAA GAG CGT TTC CAT GCC GCT CAC TTG GCC ACT GGT GAC ATG
   T  Q  A  P  N  L  Q  E  R  F  H  A  A  H  L  A  T  G  D  M
+121 TTG AGA TCT CAA ATC GCA AAG GGC ACT CAA TTA GGT TTG GAA GCA AAG AAA ATT ATG GAC
   L  R  S  Q  I  A  K  G  T  Q  L  G  L  E  A  K  K  I  M  D
+181 CAA GGT GGT TTA GTC TCT GAT GAC ATT ATG GTT AAC ATG ATC AAG GAT GAA TTG ACC AAC
   Q  G  G  L  V  S  D  D  I  M  V  N  M  I  K  D  E  L  T  N
+241 AAT CCA GCT TGT AAG AAT GGG TTC ATC TTG GAC GGT TTC CCA AGA ACC ATT CCT CAG GCT
   N  P  A  C  K  N  G  F  I  L  D  G  F  P  R  T  I  P  Q  A
+301 GAA AAA TTG GAC CAA ATG TTG AAA GAA CAA GGA ACT CCT TTG GAA AAA GCC ATC GAA TTG
   E  K  L  D  Q  M  L  K  E  Q  G  T  P  L  E  K  A  I  E  L
+361 AAG GTT GAT GAT GAA TTG TTG GTT GCC AGA ATT ACC GGT AGA TTA ATT CAC CCA GCC TCT
   K  V  D  D  E  L  L  V  A  R  I  T  G  R  L  I  H  P  A  S
+421 GGC AGA TCC TAC CAC AAG ATC TTT AAC CCA CCA AAG GAA GAC ATG AAG GAT GAC GTC ACC
   G  R  S  Y  H  K  I  F  N  P  P  K  E  D  M  K  D  G  D  V  T
+481 GGT GAA GCT TTA GTT CAA AGA TCT GAT GAC AAT GCA GAC GCC TTG AAG AAG AGA TTA GCT
   G  E  A  L  V  Q  R  S  D  D  N  A  D  A  L  K  K  R  L  A
+541 GCT TAC CAT GCT CAA ACC GAA CCA ATT GTT GAC TTT TAC AAA AAG ACC GGT ATC TGG GCT
   A  Y  H  A  Q  T  E  P  I  V  D  F  Y  K  K  T  G  I  W  A
+601 GGT GTT GAT GCT TCC CAA CCT CCT GCT ACT GTT TGG GCT GAC ATC TTG AAC AAG CTA GGT
   G  V  D  A  S  Q  P  P  A  T  V  W  A  D  I  L  N  K  L  G
+661 AAG GAT TAA TGA CCTTGCCAATGCTCTCTAAATATCTTTCTTTTAAATTAATGAAAAATAATAAAATTTT
   K  D  *  *
+737 TGTATGTGAGTACATATATCCGCAGTATACTATAAATGAAATAATAACATAAGTGTGTTGTAAGTGGCTATAACGTCCTTA
+817 AACATGTGCACTGCCATTAAGTACTTAGTCAATATTTTATCGTTGAGAACGAACGCAAAATCATATTACTAAATAGATGA
+897 ACAAAAGCGCATCACATAAAACAAAACGGTATAACAGTAATAGTGAAGCTT

```

Abb. 12: DNA-Sequenz des Adenylatkinase-Gens (AKY) aus Hefe

Die Aminosäuresequenz, ermittelt durch die DNA-Sequenz, ist jeweils in der zweiten Zeile angegeben. TATA-ähnliche Elemente, das Hexanukleotid CACACA und mögliche Terminationssignale sind oberhalb der Sequenz durch Balken, Palindromstrukturen an den Terminationssignalen durch Pfeile, angedeutet.

3. Analyse der 5' und 3' flankierenden Regionen des AKY-Gens

Die Initiationsstellen der Transkription wurden durch Kartierung der 5'-Enden der AKY-mRNA in einem Fragmentelongationsversuch bestimmt (nicht gezeigt). Ein 45 bp Hinf I/Rsa I Fragment, das aus dem N-terminalen Bereich der codierenden Sequenz des AKY-Gens stammt (Pos. +16 - +60 [Bezug relativ zum A des Startcodons von AKY], Abb. 18) wurde isoliert, endmarkiert, mit Hefe Gesamt-RNA hybridisiert und das gebildete RNA/DNA-Hybrid mit Hilfe der reversen Transkriptase bis zum 5'-Ende der mRNA verlängert. Die Länge der gebildeten cDNAs wurden anhand einer Sequenzleiter ermittelt. Es konnten insgesamt 5 majore Initiationsstellen (-23, -45, -46, -49 und -60) identifiziert werden, wobei das Signal an Pos. -60 das stärkste darstellt.

Multiple Initiationsstellen sind in den meisten bis jetzt untersuchten Hefegenen zu beobachten, das CYC1-Gen z. B. besitzt mehr als 30 Initiationsstellen, das CYC7-Gen eine majore und zwei minore (McNeil & Smith, 1986; Healy et al., 1987). Alle majoren Initiationsstellen fallen im AKY-Promoter mit einem A-Rest zusammen, einer Konsensusregel gehorchend, daß die Initiation in Hefe bevorzugt an einem Purin (A>G) erfolgt (Sripati et al., 1976). Vergleiche der Umgebung verschiedener Initiationsstellen in Hefe zeigen eine schwache Bevorzugung für die Sequenz PyAAPu: von 99 untersuchten Stellen zeigten 80 keine oder lediglich eine Fehlpaarung zu dieser Konsensussequenz. In den 80 Tetranukleotiden war die Konservierung wie folgt: Py, 94%; A, 92%; A, 73%; Pu, 74%. In dieser Sequenz erfolgt die Initiation präferentiell an der zweiten Base (Healy et al., 1987). Keine der identifizierten majoren Initiationsstellen des AKY-Gens korreliert mit dieser Konsensussequenz, die aber an Pos. -55 bis -58, bzw. -30 bis -33 zweimal auftritt. Interessanterweise sind in diesen Bereichen bei der Fragmentelongation schwache (und jeweils mehrere) Signale zu beobachten (nicht gezeigt). Die Initiation der Transkription erfolgt dagegen im AKY-Promoter bevorzugt an einem Dinukleotid PyA (Abb. 18), den ersten beiden Basen in der vorgeschlagenen Konsensussequenz,

die auch am stärksten konserviert sind. Der relativ große Bereich (40 - 120 bp) innerhalb der das TATA-Element in Hefe zu wirken vermag, sowie die geringe Konservierung der Initiationsumgebung sind wahrscheinlich für die multiplen Initiationsstellen in Hefe verantwortlich. Der nicht-translatierte 'Leader'-Bereich der verschiedenen AKY-Transkripte ist, wie in Hefe normal, mit ca. 20 bis 70 Basen relativ kurz. Das erste in den mRNAs auftretende AUG stellt das Startcodon für das AKY-Proteins dar.

Zwei TATA-ähnliche Elemente liegen bei Pos. -55 bzw. -111 (Abb. 12) wobei die TATA-Box von Pos. -111 bis -122 wahrscheinlich die Initiation der meisten Transkripte bewirkt. Sie liegt 51-88 bp oberhalb der fünf beobachteten majoren Initiationsstellen (Abb. 18). Diese TATA-Box ist Teil einer Sequenz, die aus insgesamt 20 alternierenden Purinen und Pyrimidinen besteht. Die näher am Startcodon liegende TATA-ähnliche Sequenz stellt höchstens das Element für die Initiation der Transkription an Pos. -23 dar. Sie ist jedoch lediglich 32 bp von der Initiationsstelle entfernt. In Hefe scheint das TATA-Element jedoch stets mindestens 40-45 bp oberhalb der Initiationsstellen lokalisiert zu sein (Healy et al., 1987; Struhl, 1987).

Nähe dem Startcodon (Pos. -19 bis -24) tritt die Sequenz CACACA auf (Abb. 12). Dobson et al. (1982) stellten fest, daß das Hexanukleotid CAPyACA den Initiationscodons mehrerer stark exprimierter Hefegene vorangeht, die Funktion ist jedoch nicht geklärt. Auch die Startcodonumgebung selbst ist im AKY-Gen konserviert: an Pos. -3 wird ein G, an Pos. +6 ein T gefunden (Abb. 12). Für Hefe wird das Vorhandensein eines Purins (-3), bzw. eines Pyrimidins (+6) an diesen Positionen für eine effiziente Translationsinitiation gefordert (Dobson et al., 1982). Die mRNAs der glykolytischen Enzyme, ribosomalen Proteine oder Histone, also von extrem hoch exprimierten Genen, besitzen an Pos. -3 jedoch immer einen A-Rest; in den ersten 7 Basen 5' oberhalb der Pos. +1 tritt nie ein G-Rest auf (Hamilton et al., 1987). Ein Vergleich der AUG-Kontexte verschiedener Gene (u.a. AKY, HTA1, PFY und GCY) ist in Tabelle 9 aufgeführt.

In der 3' flankierenden, nicht translatierten Region des AKY-Gens tritt die Sequenz AATAAA 58 bp unterhalb der Doppelstoppcodons TAA TGA auf (Abb. 12). Diese Sequenz (bzw. modifizierte Formen davon) stellt das Signal für die 3' Prozessierung und anschließende Polyadenylierung der - eher unspezifisch terminierten - Primärtranskripte höherer Eukaryonten dar (Darnell, 1982; Birnstiel et al., 1985). In vielen Hefegenen, unter anderem in den Strukturgenen für Iso-1- bzw. Iso-2-Cytochrom c, fehlt dieses Signal jedoch. Es ist daher wahrscheinlich für die 3' Prozessierung nicht entscheidend. Zudem scheinen die Termination der Transkription und die Polyadenylierung der mRNA im Gegensatz zu den höheren Eukaryonten in Hefe miteinander gekoppelt zu sein. Daher wird in Hefe ein grundsätzlich anderer Mechanismus diskutiert: nach der Termination der Transkription (vergleichbar der rho-abhängigen Termination in Prokaryonten) wird jede mRNA ohne weitere Prozessierung polyadenyliert (Henikoff et al., 1983). Bei Pos. +733 und +851, 64 bp bzw. 182 bp 3' unterhalb des Stopcodons (Abb. 12) treten im AKY-Gen zwei miteinander verwandte Sequenzmotive auf: TTTTGTATGT bzw. TTTTATCGT (Konsensus: TTTTATA(T)GT). Dieses Sequenzelement tritt mit geringen Variationen im 3' flankierenden Bereich mehrerer anderer Hefegene, darunter CYC1, auf (Tab. 3). Im CYC1-Gen wurde eine 38 bp-Deletionsmutante isoliert, die die Sequenz TTTTATAGT in der 3'-nicht-codierenden Region des Gens überdeckt. Die - im Wildtyp an einer spezifischen Stelle auftretende - Termination der Transkription wird in dieser Mutante unspezifisch und es können multiple, teilweise extrem lange Transkripte beobachtet werden (Henikoff et al., 1983; Zaret & Sherman, 1982). Henikoff et al. schlugen die Sequenz TTTTATA als effizienten Terminator der Transkription vor. Zaret & Sherman hingegen, die die selbe Deletionsmutante analysierten, kamen zu einem anderen Ergebnis: sie identifizierten das aus drei Teilen bestehende Signal TAG ... TAGT (oder TATGT) ... TTT als den Terminator, wobei lediglich das zentrale Motiv, sowie das Tripel-T innerhalb der untersuchten Region liegen. Der Vergleich mehrerer Hefegene macht jedoch wahrscheinlich, daß

AKY (+733)	TTTTTGtATGT
AKY (+851)	TTTTTATC-GT
PFY	TTTTTATATGT
GcY ^c	TTTTTATATGT
HTA1	GTAACATATGT
ACT1	TTTATGTATGT
CYC7	TTTTTACA-GT
MATa1	TTTGTTTATGT
RP51	GCGTTTTATGT
G3PDH	TTTTTATA-GC
CYC1	TTTTTATA-GT
Konsensus:	TTTTTaTAtGT

Tab. 3: Vergleich möglicher Terminations- und/oder 3'-Prozessierungssignale verschiedener Hefegene (ACT1; CYC7; MATa1; RP51; G3PDH und CYC1, aus: Zaret & Sherman, 1982; AKY, PFY, GcY, HTA1, diese Arbeit).

^c: Terminationssignal tritt im komplementären Strang auf.

beide vorgeschlagenen Motive, das Signal TTTTTATA (bzw. eine T-reiche Region) und das zentrale Motiv des dreigeteilten Signals (TAGT oder TATGT) zusammen eine optimale Termination in Hefe bewirken (Tab. 3). In der Nähe dieser potentiellen Terminationssignale können häufig kurze Palindromstrukturen festgestellt werden (Abb. 12, s.a. HTA1, diese Arbeit).

4. Codonauswahl und Vergleich mit dem AK-Gen aus *E. coli*

Tabelle 4 faßt die Codonauswahl des AKY-Gens zusammen. Insgesamt 42 verschiedene Codons treten in der codierenden Sequenz auf. Bennetzen & Hall (1982) stellten in Hefe, besonders ausgeprägt in hochexprimierten Genen, eine

starke Bevorzugung bestimmter Codons fest. Bei stark exprimierten Genen sind die Codonpräferenzen offensichtlich an das Auftreten häufiger tRNAs angepaßt. Der nach Bennetzen & Hall berechnete Codon Bias Index (CBI) beträgt für das AKY-Gen 0.66, ein Wert der mit dem CBI des Histon H2A-2- (0.68), des Histon H2B-2- (0.71), des ribosomalen Protein S33- (0.63) oder des reprimierbaren Phosphatase [PHO5]-Gens (0.65) vergleichbar ist (Sharp et al., 1986). Ein hoher CBI-Wert (Werte bewegen sich zwischen ≈ 0 bis maximal 1) bedeutet die selektive Auswahl bestimmter Codons und weist auf ein hochexprimiertes Gen hin. Die Gene der glykolytischen Enzyme (wie z.B. Enolase A und B [CBI: 0.93, bzw. 0.96], Glycerinaldehyd-3-Phosphat Reduktase 1 und 3 [0.99, bzw. 0.94] oder Pyruvatkinase [0.95]) verwenden minimal 26 der 61 möglichen Codons. Schwach exprimierte Gene, wie z.B. die Gene GAL4 und GAL80 (codierend für Regulatorproteine) verwenden alle Tripletts mehr oder weniger statistisch und weisen entsprechend von 0 kaum abweichende CBI-Werte auf (0.04, bzw. 0.08). Die Korrelation zwischen Codonpräferenz und Expression des Gens wurde an über 100 Hefegenen untersucht und größtenteils bestätigt (Sharp et al., 1986).

Die H2B-2 mRNA stellt 0.4% der gesamten zellulären mRNA dar (Bennetzen & Hall, 1982), die PHO5 mRNA unter dereprimierten Bedingungen zwischen 0.5 - 1.0% (Bajwa et al., 1984). Es ist daher zu vermuten, daß das AKY-Gen ein moderat hoch exprimiertes Gen darstellt. Diese Annahme wurde in späteren Transkriptionsuntersuchungen im Vergleich zu dem Aktin [ACT1]- (CBI: 0.82) bzw. CYC1-Gen (CBI: 0.47) bestätigt (U. Oechsner, pers. Mitteilung). Neben der Nukleotidsequenz des AKY-Gens, ist lediglich die Struktur eines weiteren Adenylatkinasogens - aus *E. coli* - vollständig aufgeklärt (Brune et al., 1985). cDNA-Sequenzen sind von der cytosolischen AK1 aus Huhn (Kishi et al., 1986), sowie von den beiden Isoformen der mitochondrialen AK2 aus Rind (Kishi et al., 1987) veröffentlicht. Gleichzeitig mit der AKY-Sequenz (Magdolen et al., 1987) wurde die entsprechende cDNA-Sequenz von AKY (Proba et al., 1987) publiziert, beide Sequenzen sind im codierenden Bereich identisch.

UUU	2	{0}	UCU	5	{2}	UAU	0	{2}	UGU	1	{0}
UUC	3	{5}	UCC	3	{3}	UAC	3	{5}	UGC	0	{1}
UUA	5	{0}	UCA	1	{0}	UAA	1	{1}	UGA	-	{-}
UUG	14	{1}	UCG	0	{0}	UAG	-	{-}	UGG	2	{0}
CUU	0	{1}	CCU	5	{0}	CAU	2	{2}	CGU	1	{9}
CUC	0	{1}	CCC	0	{0}	CAC	3	{1}	CGC	0	{4}
CUA	2	{0}	CCA	8	{0}	CAA	10	{2}	CGA	0	{0}
CUG	0	{13}	CCG	0	{10}	CAG	1	{6}	CGG	0	{0}
AUU	8	{5}	ACU	5	{3}	AAU	4	{4}	AGU	0	{0}
AUC	7	{9}	ACC	6	{7}	AAC	4	{0}	AGC	1	{0}
AUA	0	{0}	ACA	0	{1}	AAA	6	{17}	AGA	8	{0}
AUG	8	{6}	ACG	0	{0}	AAG	13	{1}	AGG	0	{0}
GUU	7	{12}	GCU	12	{7}	GAU	8	{6}	GGU	13	{7}
GUC	3	{3}	GCC	7	{0}	GAC	11	{11}	GGC	3	{11}
GUA	0	{3}	GCA	3	{4}	GAA	11	{14}	GGA	1	{0}
GUG	0	{1}	GCG	0	{8}	GAG	1	{4}	GGG	1	{2}

Tab. 4: Codonauswahl im AKY-Gen

In eckigen Klammern ist die Codonauswahl des Adenylatkinase-Gens in *E. coli* angegeben.

Stark exprimierte Gene in *E. coli* zeigen ebenfalls eine signifikante Selektion bestimmter Codons. Die von *E. coli* und Hefe bevorzugten Codons für Leu, Cys, Gln, Arg, Lys und Pro, sowie zum Teil für Ala und Val unterscheiden sich jedoch (Sharp et al., 1982). Hefe- und *E. coli*-Adenylatkinase [AK] sind auf Proteinsequenzebene hoch konserviert (53.8 SD, Tab. 5): sie besitzen 48.3% identische Aminosäuren an vergleichbaren Positionen und 24.4% homologe Austausch bei drei kurzen (1, 4, bzw. 5 Aminosäuren) Deletionen/Additionen, die auf dem Protein verteilt vorliegen (Abb. 13). Auf Nukleotidebene beträgt die Homologie der codierenden Sequenz 53%, ebenfalls ein scheinbar hoher Wert. Vergleicht man jedoch die Codonauswahl in beiden Organismen (Tab. 4), so stellt

man fest, daß diese Homologie auf DNA-Ebene lediglich durch die starke Konservierung beider Proteine bedingt ist und entsprechend selten die Wobbelposition betrifft. Wäre eine Konservierung auf DNA-Niveau vorhanden, müßte die Ähnlichkeit beider DNA-Sequenzen weitaus größer sein. Die DNA-Sequenz 'paßte' sich vielmehr in dem jeweiligen Organismus der optimalen Exprimierbarkeit an. Beispielsweise entsprechen alle Prolincodons im AK-Gen aus *E. coli* (ECOAK) der Sequenz CCQ, im AKY-Gen jedoch CCU, bzw. CCA (Tab. 4). Von diesen liegen insgesamt sieben an identischen Positionen (nicht gezeigt). Weitere herausragende Beispiele sind die Lysincodons (wobei auch hier alle sechs an identischen Positionen liegenden Codons die bevorzugte Sequenz des jeweiligen Organismus [AAA in *E. coli*, AAG in Hefe] aufweisen), die Leucincodons (CUG in *E. coli* und UUG in Hefe) und, etwas weniger ausgeprägt, die Glycin- und Alanincodons. (Bei Vergleich der Triplets für Asparaginsäure [GAU, GAC], die sowohl in Hefe als auch in *E. coli* kaum eine Präferenz aufweisen (Sharp et al., 1986), sind von den zehn sich an identischen Positionen befindenden Codons lediglich zwei identisch, die restlichen weisen in der Wobble-Position wahllos ein C oder U auf.) Der Vergleich der Codonauswahl im AKY- und ECOAK-Gen zeigt, daß z. B. bei heterologer Genexpression bzw. Herstellung synthetischer Gene zur Erzielung hoher Expressionsraten, den Codonpräferenzen der jeweiligen Organismen Rechnung getragen werden sollte. Untersuchungen am Phosphoglyceratkinase-Gen (PGK1; CBI: 0.91) in Hefe durch Austausch bis zu 39% aller Codons von bevorzugten zu minoren ergaben eine 10-fache Reduktion der Genexpression. Interessanterweise ist hierbei eine 3-fache Reduktion der 'steady state' Konzentration der mRNA der PGK1, wahrscheinlich durch Destabilisierung der RNA infolge einer verlangsamten Translationsrate an den minoren Codons, zu beobachten (Hoekema et al., 1987).

5. Analyse der abgeleiteten Proteinsequenz des AKY-Gens

Die Identifizierung des AKY-Genprodukts (YAK) erfolgte durch Homologievergleich mit Aminosäuresequenzen bereits bekannter Proteine. Hierbei zeigte sich, daß die aus der Nukleotidsequenz abgeleitete Primärstruktur des Gens mit der bereits publizierten Aminosäuresequenz der Adenylatkinase aus Hefe (isoliert aus dem Cytoplasma) nahezu identisch ist (Tomasselli et al., 1986). Am N-Terminus sind im Vergleich zum maturen Protein zwei zusätzliche Aminosäuren (Met-Ser) codiert. Diese werden offensichtlich posttranslational abgespalten, da die N-terminale Aminosäure des maturen Proteins (Ser, Pos. 3 der Proteinsequenz in Abb. 12) acetyliert vorliegt (Tomasselli et al., 1986). Vier der ersten sechs N-terminalen Aminosäuren sind Serinreste. Auffälligerweise werden diese von jeweils verschiedenen Codons, darunter die einzigen im ORF verwendeten zwei minoren Serincodons (AGC, UCA), bestimmt (Abb. 12; Tab. 4). Der N-Terminus hat einen relativ hohen Anteil an polaren Aminosäuren und besitzt keine Strukturen, die mitochondrialen Präsequenzen ähneln. Die codierte C-terminale Aminosäure entspricht einer Asparaginsäure im Gegensatz zu einem Asparagin des prozessierten Proteins (Tomasselli et al., 1986). Es ist wahrscheinlich, daß diese Aminosäure ebenfalls posttranslational modifiziert wird. Das Molekulargewicht des maturen Proteins beträgt 24077.

Adenylatkinasen sind kleine, monomere Enzyme, die die Reaktion $\text{MgATP} + \text{AMP} \leftrightarrow \text{MgADP} + \text{ADP}$ katalysieren. Neben den zwei Isoenzymen im Cytoplasma (AK1) bzw. im Intermembranraum (IMS) der Mitochondrien (AK2), besitzen höhere Eukaryonten eine weitere Phosphotransferase (AK3), die MgGTP statt MgATP als Substrat benutzt und in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist. Die Enzymaktivität der Adenylatkinasen ist essentiell für die Herstellung von ADP, bzw. ATP, also unentbehrlich für die Zelle. Die Anzahl der Adenylatkinasen in Hefe wird kontrovers diskutiert: einige Arbeitsgruppen (Chiu et al., 1967; Ito et al., 1980; Tomasselli et al., 1986; Egner et al., 1987) fanden - analog zu *E. coli* -

lediglich eine Adenylatkinase (im Cytoplasma lokalisiert), während andere zusätzlich eine Adenylatkinaseaktivität in den Mitochondrien (IMS) identifizierten (Bandlow, 1972; Bandlow & Bauer, 1975; Daum et al., 1982).

YAK weist eine signifikante Homologie zu cytoplasmatischen Adenylatkinasen von Vertebraten auf, z. B. zur AK1 aus Rind [BOAK1] (Kuby et al., 1984); hier entspricht die Homologie 37.2 SD-Einheiten (Tab. 5). BOAK1 ist im Vergleich zu YAK am N-Terminus um zwei, am C-Terminus um eine Aminosäure länger; im mittleren Abschnitt des YAK-Proteins ist jedoch eine Insertion von 31 aufeinanderfolgenden Aminosäuren festzustellen (Abb. 13). Überraschenderweise ist eine entsprechende, hoch konservierte Insertion an der selben Stelle ebenfalls in der mitochondrialen AK2 aus Rind [BOAK2] (Frank et al., 1986) vorhanden. Die Homologie von YAK und BOAK2 beträgt 86.8 SD-Einheiten, ein signifikant höherer Wert als zur cytoplasmatischen BOAK1 (Zum Vergleich: bei den cytoplasmatischen Adenylatkinasen von Mensch und Hase (Kuby et al., 1984; von Zabern et al., 1976) sind 185 von 194 Aminosäuren identisch (keine Lücke), der Homologiegrad entspricht hier 93.8 SD-Einheiten.) BOAK2 ist im Vergleich zu YAK zehn Aminosäuren am N-Terminus, sowie sieben Aminosäuren am C-Terminus länger; die optimale Anordnung der beiden Proteine erfordert lediglich das Einführen einer Lücke von einer Aminosäure in BOAK2 (Abb. 13). An 125 von 221 vergleichbaren Positionen befinden sich identische (56.6%), bei weiteren 38 Positionen homologe Aminosäuren (17.2%). D.h. 73.4% aller Aminosäuren der Hefe Adenylatkinase entsprechen identischen, bzw. homologen Aminosäuren an gleichen Positionen beim mitochondrialen Isoenzym BOAK2 des Rindes. Bei Vergleich von BOAK1 und YAK sind es lediglich 53.9% (29.3% identische, 24.6% homologe Aminosäuren). Selbst ohne Betrachtung der hochkonservierten 31 Aminosäure-Insertion (mit 26 identischen von 31 möglichen Aminosäuren) sind bei Vergleich von BOAK2 und YAK immer noch mehr als die Hälfte (52%) aller Aminosäuren an entsprechenden Positionen identisch! Dies illustriert die deutlich höhere Ver-

	YAK	BOAK1	BOAK2	BOAK3	ECOAK
YAK [24077]	-	29.3%	56.6%	40.8%	48.3%
BOAK1 [21681]	37.2				
BOAK2 [26104]	86.8	28.8			
BOAK3 [25469]	47.2	26.5	44.1		
ECOAK [23559]	53.8	34.3	55.2	43.2	

Tab. 5: Homologievergleich von YAK mit anderen Adenylatkinasen.

Das angewandte Computerprogramm ALIGN (Barker et al., 1983) bestimmt die optimale Anordnung zweier Proteinsequenzen (s.a. Material und Methoden). Die Berechnung erfolgt nach dem Algorithmus von Needleman & Wunsch (1970). Die angegebenen Werte [A, in SD-Einheiten] werden wie folgt berechnet: zunächst wird der maximale Wert der Übereinstimmung [R], sowie der Durchschnittswert der maximalen Übereinstimmung [M] mehrerer zufällig erzeugter Permutationen der Proteinsequenzen bestimmt. Die Differenz aus R und M wird durch die Standardabweichung [D] der zufällig gewonnenen Werte dividiert ($A = R - M / D$). YAK, Adenylatkinase aus Hefe; BOAK1, AK1 aus Rind; BOAK2, AK2 aus Rind; BOAK3, AK3 aus Rind; ECOAK, Adenylatkinase aus *E. coli*. In eckigen Klammern sind die Molekulargewichte der jeweiligen Adenylatkinasen angegeben. In der ersten Zeile sind die % identischen Aminosäuren an vergleichbaren Positionen von YAK zu den anderen Adenylatkinasen angegeben.

Abb. 13: 'Alignment' der Aminosäuresequenzen verschiedener Adenylatkinasen (AK).

Die optimale Anordnung der Proteinsequenzen erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms ALIGN (Barker et al., 1983; s.a. Tab. 5). Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben. Identische Aminosäuren sind eingerahmt. Das Symbol * kennzeichnet diejenigen Aminosäuren, die in allen verglichenen Adenylatkinasen konserviert sind. BOAK1 = cytoplasmatische AK aus Rind; BOAK2 = AK des Intermembranraums der Rindermitochondrien; BOAK3 = AK der mitochondrialen Matrix aus Rind; ECOAK = AK aus *E. coli*; AKY = AK aus Hefe

BOAK1: -- -- -- M E E K L K K A K I I F V V G G P G S G K G T Q C E K I V Q K Y G Y T H L S T G D L L R A E V S S G S A R G
 AKY: -- -- -- M S S E S I R M V L I G P P G A G K G T Q A P M L Q E R F P H A A H L A T G D M L R S Q I A K G T Q L G
 BOAK2: A P M V P A A E P V P H S P K G V R A V L L G P P G A G K G T Q A P M L A K M F C V C H L A T G D M L R A M V A S G S E L G
 BOAK3: -- -- -- M R I I L L G A P P G A G K G T Q A Q P Y I M E K Y G I P Q I S T G D M L R A A V K S G S E L G
 BOAK3: -- -- -- G A S A R L L R A I M G A P G S G K G T V S S R I T K H F E L K H L S S G D L L R D M L R C I E I G

BOAK1: K M L S E I M E K G Q L V P L E T V L D M L R D A M V A K V N T S K G F L I D G Y P R Q V Q G E E F E R R I A Q P T L L L
 AKY: L E A K K I M D Q G G L V S D D I M V M I K D E L T M P A C K N G F L L D G F P R T I P Q A E K L D Q M L K E Q C T P L
 BOAK2: K K L K A T M D A G K L V S D E M V L E L I E K M L - E T P P C K N G F L L D G F P R I V R Q A E M L D D L M E K R K E K L
 BOAK3: K Q A K D I M D A G K L V T D E L V I A L V K E R I - A Q B D C R E G F L L D G F P R T I P Q A D A M K E A - - - G I N V
 BOAK3: V L A K T F I D Q G K L I P D D V M T R L V L H E L K M L T Q Y M - - V L L D G F P R T L P Q A E A L D R A Y Q - - - I

BOAK1: Y V D A G P E T M Q K R L L K R G E T S - - - - - A S G R S Y H K I F M P P P K R D M K D D V T G E A L V Q R S D D M A D A L K
 AKY: R K A J H L K V D D H L L V A A R I T G R L I H P Q S G R S Y H E E F E N P P K E P M K D D I T G E P L I R R S D D M K K A L K
 BOAK2: D S V I E F S I P D S L L I R R I T G R L I H P Q S G R S Y H H V K F N P P P K V E G K D D V T G E L T I R K D D Q E E T V R
 BOAK3: D T V J M L N V P F E V I K Q R L T A R V I H P G S G R V Y N I E F N P P K T M G I D D L T G E P L V Q R E D D R P E T V

BOAK1: K R L E I Y Y K A T E P V I A P Y E K K R G I - - - - - V R K V M A E G S V D M V F S Q V C T H L D A L K - - - - -
 AKY: K R L A Y H A Q T E P I V D F Y K K T G I - - - - - V A G V D A S Q P P A T V W A D I L N K L G K D - - - - -
 BOAK2: I R L E A Y H T Q T T P L V E Y S K R G I - - - - - H S A I D A S Q T P D V V F A S I L A A F S K A T C K D L V M - - - - -
 BOAK3: K R L V E Y H Q M T A P L I G Y Y S K E A E A G M T K Y A K V D G T K P V A E V R A D L E K I L G - - - - -
 BOAK3: K R L K A Y E A Q T E P V L E Y Y R K K G V - - - - - L E T F S G T E T - M K I V P H V Y A F L Q T K L P Q R S Q E T S V T P

wandschaft von YAK zu der, im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisierten, BOAK2 im Vergleich zum cytoplasmatischen Isoenzym BOAK1.

Auch die Adenylatkinase aus *E. coli* (Brune et al., 1985) und die GTP:AMP Phosphotransferase aus Rind [BOAK3] (Wieland et al., 1984) besitzen, mehr oder weniger gut konserviert, die 31 Aminosäure-Insertion (Abb. 13). Die Homologie dieser Enzyme zu YAK ist jedoch nicht so ausgeprägt wie die von BOAK2 zu YAK, aber ebenfalls deutlich höher als die von BOAK1 zu YAK (Tab. 5). Es scheint zwei Typen der Adenylatkinaseenzyme zu geben: a) Die kurze Form; in diese Gruppe gehören die cytoplasmatischen Adenylatkinasen der Vertebraten (Heil et al., 1974; von Zabern et al., 1976; Kuby et al., 1984; Kishi et al., 1986). Diese sind untereinander hoch konserviert (die AK1-Sequenzen von Mensch, Rind, Hase, Schwein, sowie Huhn sind zwischen 85-95% identisch). b) Die lange Form mit der 31 Aminosäure-Insertion. Diese Gruppe wird von den mitochondrialen Isozymen, sowie vom *E. coli*-Enzym gebildet. YAK muß aus Homologiegründen der zweiten Gruppe zugerechnet werden.

6. Gendisruption von AKY und Analyse des Phänotyps

Ob in Hefe neben der cytoplasmatischen Adenylatkinase eine oder mehrere Isoenzyme existieren, ist umstritten (s. II.5.). YAK offenbart eine viel ausgeprägtere Homologie zu der mitochondrialen AK2 von Vertebraten als zu der cytosolischen Form (AK1), YAK könnte daher das, im Intermembranraum lokalisierte, mitochondriale Isoenzym darstellen. Um eine Klärung der widersprüchlichen Angaben hinsichtlich der Zahl der Isoenzyme in Hefe, sowie einen Hinweis auf die Lokalisation des AKY-Genprodukts in der Zelle zu erhalten, wurde das AKY-Wildtypgen durch ein disruptiertes, nicht-funktionelles Allel in haploiden (und diploiden) Zellen ersetzt.

Ausgangspunkt der gezielten Inaktivierung des AKY-Gens war Klon pAHH1400. Dieser enthält Teile der codierenden Region und des 5'-flankierenden Bereichs

des AKY-Gens (Abb. 11B und C). pAHH1400 besitzt nahe dem 5'-Terminus des AKY-Gens (Pos. +210, 71 Codons) eine singuläre Hpa I-Schnittstelle. Nach Linearisierung wurde ein 2300 bp Hpa I-Fragment, das das vollständige LEU2-Gen der Hefe als selektierbaren Marker enthält, in den geöffneten Vektor ligiert. Das 2300 bp-Fragment stammte aus dem *E. coli*/Hefe-Shuttlevektor YEp13 (Abb. 17). LEU2 codiert für das Enzym α -Isopropylmalat-Dehydrogenase und kann entsprechende *E. coli*-Mutanten (leuB) komplementieren (Ratzkin & Carbon, 1977). Daher wurde als *E. coli*-Empfängerstamm SF8 (leuB, thr⁻, amp^r) gewählt und die Plasmide Ampicillin-resistenter Transformanten, die in leucinfreiem Medium wachsen konnten, durch Restriktionsanalyse weiter untersucht: Spaltung mit Hind III, bzw. Hpa I ergab, daß sie - ohne Ausnahme - das Plasmid, mit dem LEU2-Gen (Hpa I 2300 bp-Fragment) in die singuläre Hpa I-Schnittstelle von pAHH1400 inseriert, enthielten. Die Orientierung der Insertion des Hpa I-Fragments wurde lediglich bei einem Klon, pakyP, mit Hilfe von Restriktions-spaltungen mit Sal I, bzw. Kpn I bestimmt (Abb. 14).

pUC19/1400 AKY

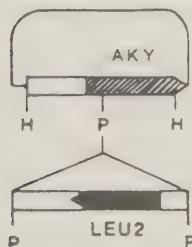


Abb. 14: Konstruktion eines disrumptierten AKY-Gens

Das Hefe LEU2-Gen, auf einem 2300 bp Hpa I-Fragment codiert, wurde in die singuläre Hpa I-Schnittstelle des Klons pAHH1400 (nahe dem 5'-Ende des AKY-Gens) ligiert (pakyP). Das Konstrukt wurde mit Hind III exzisiert und das 3700 bp (lineare) Fragment in die Hefetransformation eingesetzt, um den AKY-defekten Stamm akyD0, aky::LEU2 zu erhalten. Nur relevante Restriktionsstellen sind gezeigt; P, Hpa I; H, Hind III. Die Orientierung der beiden Gene sind durch Pfeile angedeutet.

Das neukonstruierte Fragment (Teile der codierenden Sequenz des *AKY*-Gens, unterbrochen durch das *LEU2*-Gen) wurde aus *pakyP* mit *Hind* III exzisiert und als lineares Fragment in geeignete Hefestämme (AH215 *leu2*, bzw. AH22xAH33 *leu2/leu2*) transformiert um nicht-funktionelle Allele des Adenylatkinase-Gens durch 'site-directed'-Rekombination (Rothstein, 1983) zu erhalten. Hefe besitzt, im Gegensatz zu höheren Eukaryonten, ein effizientes System für homologe Rekombination. Bei Transformation eines linearen (Hefe-DNA) Fragments, kommt es häufig durch zweifache 'Crossover'-Ereignisse, bevorzugt an den hochrekombinogenen freien Enden des Fragments, zum Austausch der chromosomalen und fragmentcodierten Information an den homologen Stellen im Genom. Die homologe Rekombination des Selektionsmarkers (*LEU2*) mit dem mutierten Allel des Hefe-Empfängerstamms tritt wegen der internen Lage des Gens im Fragment selten auf.

LEU2⁺-Transformanten wurden isoliert und zunächst auf die stabile Integration des *LEU2*-Gens in das Genom der Empfängerstämme überprüft (s. *Material und Methoden*). Drei der haploiden Transformanten, sowie eine diploide, wurden schließlich durch Southern Blot-Analyse auf die 'site-specific'-Rekombination des Fragments mit dem *AKY*-Gen getestet. Hierfür wurde aus den Transformanten (und dem Wildtyp AH215) genomische DNA präpariert, diese mit *Hind* III gespalten, auf einem Agarosegel aufgetrennt und auf NC-Papier transferiert. Dieser Filter wurde mit radioaktiv markierten Fragmenten des *AKY*-Gens (Abb. 15A) und (später) des *LEU2*-Gens (Abb. 15B) hybridisiert. Abbildung 15A zeigt, daß durch die Insertion des 2300 bp *LEU2*-Fragments in das *Hind* III-Fragment des *AKY*-Gens das Hybridisierungssignal des Wildtyps (Spur 7) von 1400 bp auf die erwartete Größe (3700 bp) in den haploiden Disruptanten (Spuren 3-5) vergrößert wird. Die diploide Transformante offenbart sowohl das Wildtyp- als auch das disruptierte Fragment (Spur 6). In den Spuren 1 und 2 sind die entsprechenden Hybridisierungssignale der mit *Hind* III gespaltenen Vektoren *pAHH1400*, bzw. *pakyP* (Abb. 14) als Vergleich zu sehen. Die Hybridisierung mit

der LEU2-spezifischen Probe markiert, neben dem Mutantenallel des Empfängerstamms (ca. 5000 bp), das gleiche Fragment der Disruptanten wie das radioaktiv markierte AKY-Fragment (3700 bp, Abb. 15B)

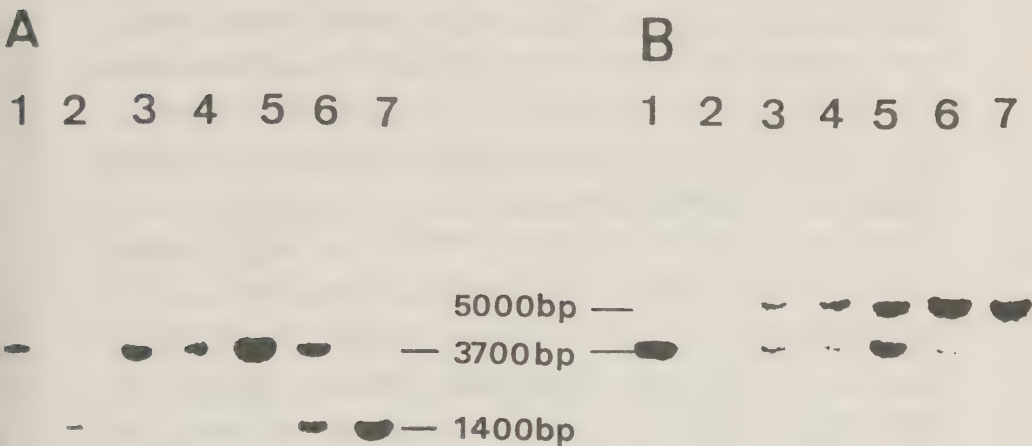


Abb. 15: Nachweis der Disruption des AKY-Gens

A) genomische Hefe-DNA verschiedener LEU⁺-Transformanten und des Wildtyps AH215, sowie Plasmid-DNA (pAHH1400, pakyP) wurden mit Hind III gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt, auf NC-Papier transferiert und mit einem radioaktiv markierten 270 bp AKY-spezifischen Hind II/Hind III-Fragment hybridisiert. Spur 1, disrumptiertes Kontrollplasmid pakyP; Spur 2, nicht disrumptiertes Ausgangsplasmid pAHH1400; Spuren 3-5, genomische DNA von drei haploiden Disruptanten; Spur 6, diploide Disruptante; Spur 7, genomische DNA des Wildtyps AH215. B) gleicher NC-Filter, mit einem nicktranslatierten, LEU2-spezifischen Hpa I-Fragment hybridisiert.

Die Southern Blot-Analyse der Disruptanten zeigt auch, daß das AKY-Gen pro haploidem Genom nur einmal vorhanden ist. Die Hybridisierung mit einem 270 bp Hind II/Hind III-Fragment, das ausschließlich codierende Sequenzen des AKY-Gens

(Abb. 16) enthält, ergibt schon bei dem Wildtyp lediglich eine singuläre Bande von etwa 1400 bp (Abb. 15A, Spur 7). Hierbei könnte aber zufällig die Fragmentgröße einer zweiten identischen Genkopie, die die 270 bp-Sequenz enthält, ebenfalls 1400 bp betragen und somit eine Fehlinterpretation verursachen. Die Disruption des AKY-Gens (mit der Insertion des LEU2-Fragments in den codierenden Bereich) zeigt jedoch eindeutig, daß AKY als 'single copy'-Gen pro haploidem Genom in Hefe vorliegt (Abb. 15A, Spuren 3-5). Würde AKY in mehreren identischen Genkopien vorliegen, müßten die haploiden Disruptanten ein zweites Hybridisierungssignal aufweisen.

Die haploiden, im AKY-Gen disruptierten Transformanten sind lebensfähig, wachsen aber sehr langsam auf Glukosemedium (Generationszeit: $\approx$ 8 h; Empfängerstamm AH215: 1.5 h). Die Disruptanten sind jedoch nicht in der Lage auf Glycerin zu wachsen, also nicht-vergärbare Substrate zu verwerten: sie besitzen einen pet-Phänotyp. Der Besitz einer Adenylatkinaseaktivität in der Zelle ist essentiell für die Herstellung von ADP, bzw. ATP aus AMP. Die Tatsache, daß haploide AKY-Mutanten lebensfähig sind zeigt, daß 1) mindestens zwei Isoenzyme mit Adenylatkinaseaktivität in Hefe vorhanden sein müssen und 2) das zweite Isoenzym nur partiell in der Lage ist, den Ausfall von AKY zu komplementieren. Die Unfähigkeit der haploiden Transformanten, auf nicht-vergärbaren C-Quellen zu wachsen, kann zudem als erstes Indiz für die - zumindest partielle - mitochondriale Lokalisation des YAK-Proteins angesehen werden.

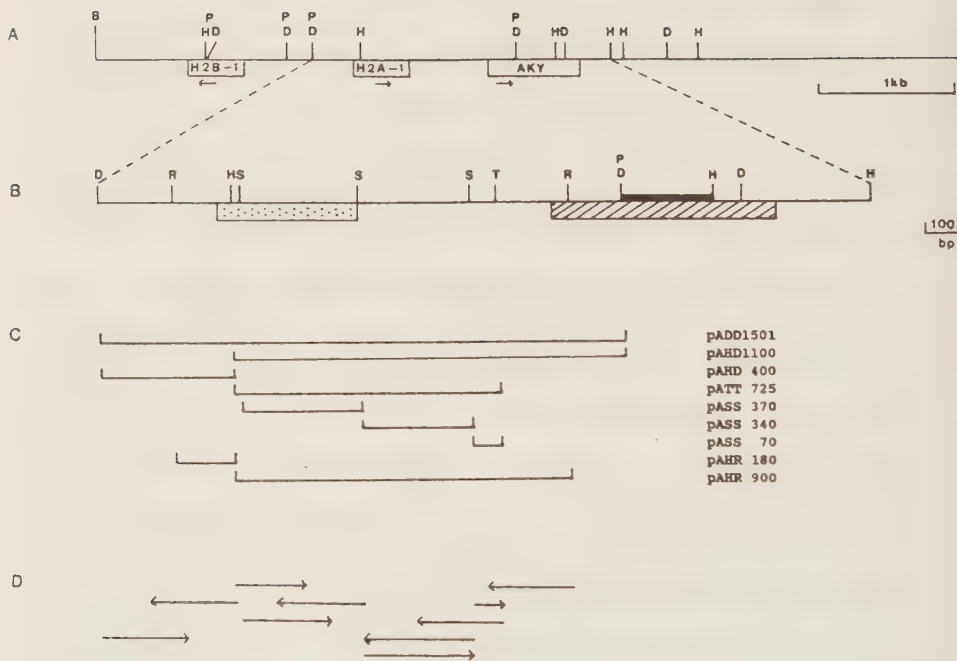
Die Transformation der haploiden Disruptante *akyD0*, *aky::LEU2* mit dem Wildtyp AKY-Gen auf einem 'multi copy'-Vektor (G. Strobel, pers. Mitteilung) stellte den PET-Phänotyp (Wachstum auf Glycerinmedium) wieder her. Dies beweist, daß der pet-Phänotyp auf der Inaktivierung des AKY-Gens und nicht auf einer zweiten, zufälligen pet-Mutation beruht.

7. Herstellung eines AKY/lacZ-Fusionsgens und Untersuchung der Expression in Hefe

Die spezifische Inaktivierung des AKY-Gens zeigte einen interessanten Phänotyp: die haploiden Disruptanten konnten, wenn auch sehr langsam, auf vergärbarem Substrat (Glukose), aber nicht auf Glyzerin wachsen. Die Herstellung eines Fusionsgens, bestehend aus dem Promoter des AKY-Gens und dem Strukturgen der bakteriellen β -Galaktosidase als Reportergen, Transformation in Hefe und Messung der exprimierten β -Galaktosidaseaktivität sollte die Frage klären helfen, ob die Transkription von AKY abhängig von der C-Quelle (z. B. Glukose, Glyzerin) erfolgt.

Die Sequenzierung des AKY-Promoterbereichs war zunächst lediglich bis zu der Taq I-Stelle bei Pos. -162 (Magdolen et al., 1987) durchgeführt worden (Abb. 12). Daher wurde zunächst die Sequenzanalyse weiter in den 5'-flankierenden Bereich (bis zu der ersten 5'-oberhalb des AKY-Gens liegenden Hpa I-Stelle, Abb. 16) vorangetrieben, zum einen um eventuell auffällige Promoterstrukturen zu identifizieren, zum anderen aber auch um geeignete Klonierungsstellen für die lacZ-Fusion zu erhalten. Eine Zusammenfassung der hergestellten Subklone des 5'-flankierenden Bereichs und die Sequenzierungsstrategie ist in Abbildung 16 C und D wiedergegeben. Insgesamt konnte damit die DNA-Sequenz von Pos. -162 bis einschließlich Pos. -1297 des AKY-Gens aufgeklärt werden (Abb. 18). Überraschenderweise ergab die Sequenzanalyse, daß AKY in unmittelbarer Nähe des Histon H2A-1-Gens (HTA1) liegt (Die Promoterstruktur von HTA1 und des intergenischen Bereichs zwischen HTA1 und AKY wird im nächsten Kapitel analysiert). Für die Herstellung des AKY/lacZ-Fusionsgens war also wichtig, daß keine Promoterstrukturen des HTA1-Gens mitkloniert wurden.

Im N-Terminus des AKY-Gens liegt an Pos. +59 eine Rsa I-Schnittstelle, die für die Herstellung eines AKY/lacZ-Fusionsgens (mit Hilfe des Vektors pMC1871) besonders geeignet war: Rsa I spaltet 20 Aminosäuren von N-Terminus des AKY-Proteins entfernt exakt zwischen zwei Codons. Die zweite verwendete Spaltstelle



100
bp

Abb. 16: Analyse des 5'-flankierenden Bereichs des Adenylatkinasegens

A) Grobe Restriktionskarte des genomischen Klons UHC3-12; die Rechtecke kennzeichnen die auf dem Fragment codierten Gene HTB1 (Histon H2B-1), HTA1 (Histon H2A-1) und AKY. Die Transkriptionsrichtung der jeweiligen Gene sind durch Pfeile angedeutet. B) 2.25 kb Region, die das AKY-Gen (schraffierter Block), sowie das HTA1-Gen (gepunkteter Block) enthält. Nur relevante Restriktionsstellen sind gezeigt. Der Balken oberhalb des AKY-Gens deutet die Lage des 270 bp Hind II/ Hind III-Fragments an, das als Hybridisierungsprobe in der Southern Blot-Analyse diente. C) Lage und Größe der hergestellten Subklone zum Sequenzieren der 5'-flankierenden Region des AKY-Gens. D) Sequenzierungsstrategie: Richtung und Länge der Sequenzierungen sind durch Pfeile angedeutet. B, Bam HI; D, Hind II; H, Hind III; P, Hpa I; R, Rsa I; S, Sau 3A; T, Taq I.

(Pvu II) befindet sich 985 bp 5' oberhalb, im codierenden Bereich des Histon H2A-1 Gens (Abb. 18). Das isolierte AKY-Promoterfragment enthielt also den gesamten intergenischen Bereich zwischen HTA1 und AKY, jedoch weder Promoterstrukturen noch den N-Terminus des HTA1-Gens. Das 985 bp-Promoterfragment wurde in den mit Sma I linearisierten Vektor pMC1871 (Casadaban et al., 1983; Abb. 6) inseriert. Dieser bakterielle Vektor enthält das gesamte lacZ-Gen mit Ausnahme der 7 N-terminalen Triplets und eines Promoters. Sma I spaltet in der codierenden Sequenz des lacZ-Gens ebenfalls zwischen zwei Codons (Abb. 6). Die Klonierung des AKY-Promoterfragments in der gewünschten Orientierung sollte also eine 'in frame'-Fusion des AKY N-Terminus (mit für die Expression in Hefe optimaler ATG-Startcodonumgebung) mit dem ATG-losen lacZ-Gen des Vektors pMC1871 gewährleisten. In der anderen Orientierung entsteht kein längerer offener Leserahmen, der von einem ATG-Startcodon angeführt wird. Da viele Hefepromotoren auch in *E. coli* die Expression der dazugehörigen Gene bewirken (Struhl, 1986; Strobel et al., 1988), wurden die, mit dem Ligationsansatz transformierten, *E. coli*-Empfängerzellen auf Agarplatten ausgestrichen, die neben Tetrazyklin (Resistenzmarker des Vektors pMC1871) auch XGal enthielten. Tatsächlich konnten mehrere Kolonien isoliert werden, die XGal zu spalten vermochten, also eine β -Galaktosidaseaktivität exprimierten (s.a. Tab. 11). Die anschließend durchgeführte Restriktionsanalyse zeigte, daß Kolonien, die auf XGal-haltigen Platten blaue Kolonien bildeten, das AKY-Promoterfragment in der gewünschten, weiße Kolonien jedoch in der falschen oder gar nicht enthielten. Die Restriktionskartierung wurde mit Hilfe der asymmetrisch im Promoterfragment liegenden Hind III-, bzw. Bgl II-Stellen (Abb. 18), sowie mit EcoRV, das lediglich Vektoranteile spaltet, durchgeführt. Der Nachweis der 'in frame'-Fusion erfolgte durch Sequenzierung eines der Plasmide (pMC/AKY), die das Fragment in der gewünschten Orientierung enthielten (nicht gezeigt).

Die Promoter/lacZ-Fusionen wurden in den Hefe-*E. coli* Shuttlevektor YEpl3 umklontiert. Hierbei wurde das Fusionsgen mit Sal I aus pMC/ARY herausgeschnitten und in die singuläre Xho I-Stelle von YEpl3 (Abb. 17) umklontiert. (Xho I und Sal I erzeugen identische 5'-überhängende Enden, diese Enden sind also miteinander kompatibel.) Die Xho I-Stelle liegt nicht in einem der beiden Resistenzgene von YEpl3. Normalerweise wäre die Klonierung in die Sal I-Stelle, die im Tetrazyklin-Resistenzgen lokalisiert ist, erfolgt; hierzu wäre aber ein Partialverdau von YEpl3 (YEpl3 besitzt zwei Sal I-Stellen) notwendig gewesen. Da aber die in *E. coli* exprimierte β -Galaktosidaseaktivität von pMC/ARY recht hoch war, konnte auf die Selektion durch Verlust der Tetrazyklinresistenz verzichtet werden. Es wurden vielmehr Klone isoliert, die auf Agarplatten in Gegenwart von XGal blaue Kolonien bildeten.

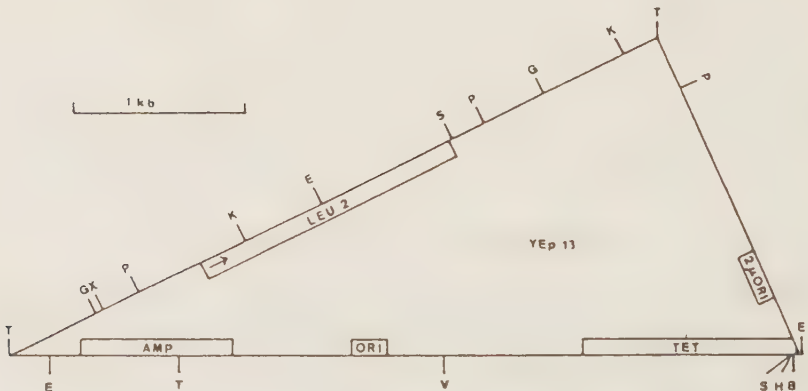


Abb. 17: Aufbau und Restriktionskarte des Hefe/*E. coli*-Shuttlevektors YEpl3

Die Selektionsmarker von YEpl3 (Broach et al., 1979) für *E. coli* (Tetrazyklin-, bzw. Ampicillin-Resistenzgen (TET, AMP)) bzw. Hefe (LEU2-Gen), sowie die Replikationsorigins (ORI, *E. coli*; 2 μ , Hefe) sind angedeutet. Die Transkriptionsrichtung des LEU2-Gens ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. B, Bam HI; E, Eco RI; G, Bgl II; H, Sph I; K, Kpn I; P, Hpa I; S, Sal I; T, Pst I; V, Pvu II; X, Xho I.

Nach Restriktionsanalyse der Plasmide aus den positiven Klonen, wurde eines der Plasmide (YEpAKYlacZ; enthält das Fusionsgen in der gleichen Orientierung wie LEU2) in zwei verschiedene Hefe-Empfängerstämme transformiert: zum einen in den atmungs-kompetenten Stamm AH215 leu2, zum anderen in den in der δ -ALA-Synthetase defizienten Stamm TO2 hem 1-1, leu2. LEU⁺-Transformanten wurden isoliert, die YEp-Plasmide aus den Hefetransformanten re-isoliert, in den *E. coli*-Wirt SF8 (leuB) rücktransformiert und durch Restriktionsanalyse überprüft: das, in die Hefetransformationen eingesetzte, Plasmid YEpAKYlacZ war identisch mit den aus AH215/ACYlacZ, bzw. TO2/ACYlacZ re-isolierten YEp-Plasmiden (nicht gezeigt). Zudem wurde nachgewiesen, daß der LEU⁺-Phänotyp der Hefetransformanten ausschließlich plasmidcodiert ist (Segregation des Plasmids bei mehrtägigem Wachstum in nicht-selektivem Medium).

In Tabelle 6 sind die gemessenen β -Galaktosidaseaktivitäten des AKY/lacZ-Fusionsgens in Hefe zusammengefaßt. Das Wachstum der Wildtyp Transformante AH215/ACYlacZ auf verschiedenen C-Quellen (Glukose, Galaktose, bzw. Glycerin) zeigt keine signifikant unterschiedliche Expression des lacZ-Gens. Das Wachstum von TO2/ACYlacZ auf Galaktose, hämfrei, bzw. durch Deuteroporphyrin IX [DIX] induziert, sowie auf Glycerin (mit δ -Aminolävulinat [δ -ALA] supplementiert) offenbart keine Kontrolle der Expression von AKY durch Häm. Die geringfügig höheren Werte bei Induktion mit DIX sind wahrscheinlich auf kleine Korrekturfehler bei der Messung der β -Galaktosidaseaktivitäten (bei 420 nm) zurückzuführen (DIX absorbiert in diesem Wellenbereich). Die etwas höheren Werte in Gegenwart von δ -ALA können durch eine allgemeine Aktivierung des Zellmetabolismus nach Supplementierung dieses Wachstoffs erklärt werden (Die Werte von TO2/ACYlacZ auf Glycerin [+ALA] entsprechen durchaus denen von AH215/ACYlacZ). Sowohl bei Induktion mit DIX als auch mit δ -ALA sind keine signifikant erhöhten Expressionsraten zu beobachten. Die Expression von AKY wird daher sehr wahrscheinlich nicht durch Häm kontrolliert.

Empfängerstamm	β -Galaktosidaseaktivität in Abhängigkeit von der C-Quelle			relative Aktivität
A) AH215/AKYlacZ:	Glu	Gal	Gly	Glu : Gal : Gly
	215.6	237.3	233.5	1.00 : 1.10 : 1.08
B) TO2/AKYlacZ:	Gal [-DIX]	Gal [+DIX]	Gly [+ALA]	Gal : Gal : Gly [-DIX] [+DIX] [+ALA]
	148.1	294.2	244.0	1.00 : 1.99 : 1.65

Tab. 6: β -Galaktosidase-Aktivitäten der AKY/lacZ-Fusionsgene in den Hefestämmen AH215 und TO2

A) Messung der lacZ-Expression in AH215/AKYlacZ in Abhängigkeit von der C-Quelle. Glu, Wachstum in einem Medium, das 3% Glukose enthielt; Gal, 2% Galaktose; Gly, 3% Glyzerin. B) Messung der lacZ-Expression in TO2/AKYlacZ. Gal [-DIX], Stamm TO2 hem1-1, gezüchtet auf einem semisynthetischen Medium in 2% Galaktose in Abwesenheit von δ -ALA, bzw. DIX. Gal [+DIX], die Durchführung des Tests erfolgte 4 h nach Supplementierung der Zellen mit 10 μ M Deuteroporphyrin IX. Gly [+ALA], TO2 hem1-1, gezüchtet in einem Medium mit 3% Glyzerin in Gegenwart von 50 μ g/ml δ -Aminolävulinat. Die angegebene β -Galaktosidase-Aktivität (in U/ml; Miller, 1972) entspricht dem Durchschnitt aus vier (AH215/AKYlacZ), bzw. drei (TO2/AKYlacZ) unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Kontrollen AH215, AH215/YEp13 und TO2/YEpilacZ (s. Tab. 2) wiesen keine nachweisbare β -Galaktosidase-Aktivität auf (nicht gezeigt).

8. Analyse des Histon H2A-1 Gens (HTA1) und des intergenischen Bereichs zwischen HTA1 und AKY

Überraschenderweise ergab die Sequenzanalyse, daß in unmittelbarer Nähe 5'-oberhalb des AKY-Gens auf dem gleichen Strang ein weiterer, aus 132 Codons bestehender, offener Leserahmen (ORF) liegt. Die codierende Kapazität dieses ORFs entspricht einem Protein von 14 kD. Der Abgleich sowohl der

Nukleotidsequenz der gesamten 5'-flankierenden Region des AKY-Gens, als auch der Proteinsequenz des ORFs mit den Sequenzdatenbanken ergab, daß der Leserahmen dem Gen für das Histon H2A-1 entspricht (Abb. 18).

Hereford et al. (1979) klonierten und analysierten erstmals die Hefe Histongene H2A und H2B. Sie konnten zeigen, daß diese Histongene dupliziert im haploiden Genom vorliegen und je eine H2A- und H2B-Kopie ein divergent transkribiertes Genpaar bilden. Im Falle des Histon H2A-1 (HTA1) und H2B-1 (HTB1) Genpaares isolierten sie ein genomisches 12 kb-Fragment (den sogenannten TRT1-Locus), auf dem neben den beiden Histongenen ein weiteres Nicht-Histongen ("Protein 1") identifiziert wurde. Durch Heteroduplexbildung von Poly(A)-RNA [Hefe Histon-mRNA ist polyadenyliert] mit der DNA des genomischen Fragments und Analyse der gebildeten 'R loops' im Elektronenmikroskop wurde die relative Lage der beiden Histongene und des Protein 1-Gens zueinander, sowie die Transkriptionsrichtungen dieser Gene bestimmt. In vitro Translation von an definierte Fragmente der 12 kb-Region von TRT1 gebundener, Poly(A)-RNA ergab zudem die Position der Gene im TRT1-Fragment. Der Vergleich der von Hereford et al. (1979) erhaltenen Daten mit denen des Klons pUHC3-12 zeigte, daß das 6 kb-Insertfragment aus pUHC3-12 Teil des früher bereits beschriebenen sogenannten TRT1-Klons darstellt. Neben AKY sind also auf pUHC3-12 zwei weitere Hefegene, HTA1 und HTB1, lokalisiert (Abb. 16A). AKY entspricht dem Gen, das für das Nichthiston-Protein ("Protein 1") codiert. Vor kurzem wurde der TRT1-Locus (also HTA1, HTB1 und AKY) u.a. durch genetische Analysen dem Chromosom IV (14.5 cM von lys4 entfernt) zugeordnet (Norris & Osley, 1987).

Die Nukleotidsequenz von Pos. -503 bis -1216 (mit dem Startcodon ATG von AKY als Pos. +1) ist mit der bereits publizierten des HTA1-Gens mit Ausnahme zweier Cytosin- statt Thyminreste bei Pos. -517, bzw. -522 (im 3'-nicht-translatierten Bereich von HTA1) identisch (Choe et al., 1982). Im Gegensatz zu der früher publizierten Sequenz, wurde der Bereich mit den kontroversen Basen

in dieser Arbeit auf beiden Strängen bestimmt, die Abweichungen sind daher eher auf Sequenzierfehler als auf etwaige Mikroheterogenitäten in dieser Region zurückzuführen. Der codierende Bereich des HTA1-Gens erstreckt sich von Pos. -956 bis -557 relativ zum ATG des AKY-Gens (Abb. 18). Die Nukleotidsequenz des Promoterbereichs des HTA1-Gens wurde von Pos. -1216 bis zu der Hind II-Stelle an Pos. -1297 erweitert (Abb. 18).

HTA1 zeichnet sich durch für stark exprimierte Gene typische Strukturen aus:

i) die Startcodonumgebung (Tab. 9) ist nahezu identisch mit der Konsensussequenz hochexprimierter Gene (Hamilton et al., 1987); ii) nahe dem Startcodon (14 b 5'-oberhalb) befindet sich das Hexanukleotid CATACA (Dobson et al., 1982); iii) im HTA1-Gen ist eine ausgeprägte Codonpräferenz (CBI: 0.78) zu beobachten (Sharp et al., 1986). Mehrere TATA-ähnliche Strukturen sind, in einem relativ großen Abstand zur codierenden Sequenz, in dem Bereich 160-180 bp oberhalb des Startcodons des HTA1-Gens lokalisiert (Abb. 18).

Ein potentielles Terminationssignal der Transkription befindet sich an Pos. -414, 142 bp 3'-unterhalb des TAA-Stopcodons von HTA1. Dieses Element enthält das Motiv TATGT (Zaret & Sherman, 1982) und ist Bestandteil einer 18 bp-Palindromsequenz (Abb. 18). Diesem Element geht jedoch keine T-reiche Sequenz voran (s. II.3).

Der intergenische Bereich zwischen HTA1 und AKY ist mit 557 bp verhältnismäßig kurz. Der AT-Gehalt ist mit 65% durchaus normal für nicht-codierende Bereiche in Hefe. Bei näherer Betrachtung fällt jedoch auf, daß die Bereiche unmittelbar nach HTA1, bzw. vor AKY (Pos. -557 bis -380, bzw. -180 bis +1) einen erheblich höheren AT-Gehalt (über 70%) aufweisen, als die Region dazwischen (54.5%). Außer dem TATA-ähnlichen Element des AKY-Gens, das Teil einer 20 bp langen Sequenz aus alternierenden Purinen und Pyrimidinen ist (Abb. 18), befinden sich in der intergenischen Region keine weiteren auffälligen Strukturmerkmale.

-1297 GTTAACTCGTCGTTGTTGAAGAAACGCCCGTAGAGATATGTGGTTTCTCATGCTGTTATTGTGCATTGCCTACTCTGTTG

-1217 ATTTCAAATCTTTTCTACCCCTTCCCGTTACGAAGCCAGCCAGTGGATCGTAAATACTAGCAATAAGTCTTGACC

-1137 TAAAAATATATAATAAGACTCCTAATCAGCTGTAGATTTTCTGGTCTGTTGAACCATCATCTATTACTTCCAATC

-1057 TGTACTTCTCTTGTGATACTACATCATCATACGGATTGGTTATTCTCAGTGAATAAACAACTTCAAACAAACAAAT

Pvu II Hind III

-977 TTCATAGATATAAAATATAA ATG TCC GGT GGT AAA GGT GGT AAA GCT GGT TCA GCT GCT AAA
M S G G K G G K A G S A A K

Bgl II

-914 GCT TCT CAA TCT AGA TCT GCT AAG GCT GGT TTG ACA TTC CCA ... 222 b ... TAA GATC
A S Q S R S A K A G L T F P . 74 AS . *

T T

-553 GGTTCGGTATTTTAAAGAAGGCGGAAGGAACAACTAACTCTCCATTGTAACTATATTAAGTGCTATTAGACCTTTC

-473 TGTTTTCTCTTTTATTTTCTATATATAATTTATGGGTATATAATTACGGTAACATATGTCATGATATATAAAT

-393 TTTTGTGTGCTCTCTGTTTTCTCTGTTGCTGTTAGGTTTCATGGGCACCTGTTGCTTACTTGAACATGATTGAGTA

-313 GCAAAACACATTCTGTGCTTTGTTCACTTTGATAGTGTGACGAAATTTTCAACCAAAGGAAAAAGCTCACGATTGGCG

-233 GATCCTGTACGGAGAACTGTCCGCAGCAGCCCGCGCTTCTGCTCTTATTCGCCCAATTTTTTTTGATTTTCGACTTTT

-153 TCACTCTGGCTAGTTTTATTACGCATATTGTTATATATATATACGCATAAAATTTCTGAAATGGATTACCTGGTTTATCAG

-73 AAACGAGAGCTTTAATAAAGAAACATTAACTTTCTCTGGTAAAGTCACCACACAGCATCAAAATATAACAGTA M
ATG

Rsa I

4 TCT AGC TCA GAA TCC ATT AGA ATG GTC CTA ATT GGC CCA CCT GGT GCC GGT AAA GGT ACT ...
S S S E S I R M V L I G P P G A G K G T .

Abb. 18: DNA-Sequenz der 5'-flankierenden Region des Histon H2A-1 Gens (HTA1) und des intergenischen Bereichs zwischen HTA1 und AKY. Die Proteinsequenz des Histon H2A-1-, sowie des YAK- N-Terminus ist unterhalb der Nukleotidsequenz angegeben. TATA-ähnliche Elemente, das Hexanukleotid CATACA und das potentielle Terminations-signal des HTA1-Gens sind unterstrichen, die Palindromstruktur am Terminationssignal durch Pfeile angedeutet. Teile der Sequenz (Pos. -503 - -1216) wurden bereits veröffentlicht (Choe et al., 1982): hierbei wurde an Pos. -517, bzw. -522 ein T statt eines C-Restes bestimmt. Die Region um das TATA-ähnliche Element des AKY-Gens mit alternierenden Purinen und Pyrimidinen ist durch eine Wellenlinie oberhalb der Sequenz gekennzeichnet. Majore Initiationsstellen des AKY-Gens sind durch geschlossene Kreise oberhalb der Sequenz angedeutet. Das 45 bp Hinf I/Rsa I-Fragment, das zur Bestimmung der 5'-Enden der Transkripte verwendet wurde ist oberhalb der Sequenz durch eine Linie angedeutet. Die, für die Herstellung und Kartierung des AKYLacZ-Fusionsgens, relevanten Restriktionsstellen sind durch senkrechte Pfeile markiert.

9. Diskussion

Die Untersuchung des Klons pUHC3-12 ergab, daß auf diesem insgesamt drei Gene codiert sind: neben dem Gen, das für die Adenylatkinase codiert (AKY), liegt auf dem genomischen 6 kb-Fragment das Histon-Genpaar HTA1/HTB1 (codierend für Histone H2A-1, bzw. H2B-1). Histongene werden - u.a. neben den Genen für glykolytische Enzyme und ribosomale Proteine - zu den hoch exprimierten Genen in Hefe gerechnet (Sharp et al., 1986). AKY stellt ein moderat hoch exprimiertes Gen dar. Die Isolierung von pUHC3-12 als Kandidat für den Besitz eines hämregulierten Gens ist daher, analog zur Isolierung von pQHC7, dadurch zu erklären, daß die auf diesem Plasmid codierten, für die Zellen wichtigen Gene nach Supplementierung mit δ -ALA überproportional transkribiert werden und so eine hämabhängige Aktivierung vorgetäuscht wird.

Die Gene der Histone H2A und H2B liegen dupliziert (und jeweils als Genpaar) im haploiden Hefegenom vor. Obwohl die Produkte der beiden H2A/H2B-Paare im Zellzyklus von *S. cerevisiae* verschiedene Funktionen zu besitzen scheinen (Norris & Osley, 1987), ist die Sequenzhomologie der entsprechenden Gene sehr hoch [HTA1 und HTA2: 93.9%; HTB1 und HTB2: 87.4%] (Choe et al., 1982; Wallis et al., 1980). Die mit dem gesamten 6 kb-Insertfragment durchgeführte Northern Blot-Analysen markierten lediglich ein (abundantes) Transkript von ca. 650 b Länge (Oechsner, 1986). Eine Abschätzung der Transkriptlänge der Histon-mRNAs am Beispiel des HTA1-Gens (Abb. 18) ergibt eine RNA zwischen 600 - 700 b: 40-120 b 5'-nichttranslatierter Leader (TATA-ähnliche Elemente des HTA1-Gens befinden sich ca. 160 bp oberhalb des Startcodons), 393 b codierende Sequenz, mindestens 150 b 3'-nicht translatierte Region (ein potentiellies Terminationssignal liegt 142 bp unterhalb des Stopcodons) und 20-60 b Poly(A)-Schwanz (Groner et al., 1974). Die codierenden Sequenzen der HTB-Gene sind lediglich um eine Aminosäure kürzer als die HTA-Gene, die Transkripte der HTA-, bzw. HTB-Gene sind vermutlich ähnlich lang. Es

ist daher wahrscheinlich, daß es sich bei dem beobachteten 'Transkript' um insgesamt vier verschiedene Histon-mRNAs gehandelt hatte, die AKY-mRNA aber zu diesem Zeitpunkt (mit dem 6 kb-Fragment als Probe) in Northern Blot-Analysen nicht identifiziert wurde.

Das AKY-Transkript ist erheblich länger als 650 b: ein kurzer nicht-translatierter Leader (23-70 b, Abb. 18), 666 b codierende Sequenz, sowie eine relativ lange 3' nicht-translatierte Region (potentielle Terminationssignale liegen 64, bzw. 182 bp unterhalb des Stopcodons, Abb. 12) ergeben eine abgeschätzte Transkriptlänge von ca. 900 b (inkl. Poly(A)); die in (mit AKY-spezifischen Proben durchgeführten) Northern Blot-Analysen bestimmte Länge beträgt ca. 1100 b (Magdolen et al., 1987). Die publizierte AKY cDNA-Sequenz (Proba et al., 1987) ist (ohne Poly(A)) 830 b lang, wobei allerdings beide Enden der cDNA (5'-Ende: 5 b; 3'-Ende: 2 b) nicht der genomischen Sequenz entsprechen, wahrscheinlich also - häufig in cDNA-Banken auftretende - Klonierungsartefakte darstellen. Die letzten der genomischen Sequenz entsprechenden Basen der cDNA kartieren am 5'-Ende bei der Pos. -33 (entspricht einer minoren Initiationsstelle), am 3'-Ende bei der Pos. +781, 48 b unterhalb eines der beiden Terminationssignale (Abb. 12). Ob diese aber natürliche mRNA-Enden darstellen, ist aufgrund der in der cDNA auftretenden Artefakte an den Enden unklar.

Der intergenische Bereich zwischen AKY und HTA1 entspricht 557 bp, beide Gene werden vom gleichen Strang transkribiert (Abb. 18). Die codierenden Sequenzen von HTA1 und HTB1 (HTA1/HTB1 werden divergent transkribiert) sind durch 812 bp (zitiert in: Osley et al., 1986) voneinander getrennt (Abb. 16). Die 3'-flankierenden Bereiche von HTB1 (mindestens 1,5 kb) und AKY (mindestens 3 kb) sind transkriptionsinaktiv, enthalten also scheinbar keine weiteren Gene (Hereford et al., 1979).

Während die Histongene in Abhängigkeit vom Zellzyklus periodisch transkribiert werden (also regulierte Gene darstellen), wird AKY - unter allen

bis jetzt getesteten Bedingungen konstitutiv exprimiert: i) Promoter/lacZ-Fusionen, bestehend aus dem gesamten intergenischen Bereich zwischen HTA1 und AKY und dem lacZ-Gen aus *E. coli*, wiesen in Hefe keine unterschiedliche Expression des Fusionsgens in Abhängigkeit der verwerteten Kohlenstoffquelle (Glukose, Galaktose und Glycerin) auf (Tab. 6A). Es ist also weder eine Katabolitrepression (durch Glukose) noch eine Induktion durch nicht-vergärbare Substrate (Glycerin) zu beobachten. ii) Transformation des Fusionsgens in die in der δ -ALA-Synthase defizienten Mutante T02 und Test der Expression der β -Galaktosidaseaktivität in hämfrei gewachsenen, bzw. mit dem Häm analog DIX induzierten Zellen ergab keine signifikanten Unterschiede (Tab. 6B). Die Transkription von AKY wird nach diesen Ergebnissen nicht durch Häm reguliert. iii) In synchronisierten Zellen bleibt die AKY mRNA-Konzentration während des gesamten Zellzyklus konstant, während die HTA1/HTB1 mRNA-Konzentration in der S-Phase um das 20-fache zunimmt (Hereford et al., 1981).

In der unmittelbar 3'-seitig anschließenden Region des HTB1-Gens befindet sich ein *ars*-Element (autonomously replicating sequence), das ebenfalls noch auf dem Insertfragment von pUHC3-12 enthalten ist: es ist zwischen dem 3'-Ende von HTB1 und der angrenzenden Bam HI-Stelle kartiert worden (Osley & Hereford, 1982). *ars*-Elemente werden als Origins der Chromosomenreplikation angesehen. Expressionstudien von HTA1-Promoter/lacZ-Fusionsgenen zeigten, daß die optimale Transkription des H2A-1 Gens abhängig von diesem (durch ein Gen [HTB1] getrenntes) *ars*-Element ist: die Integration einer einzelnen Kopie des Fusionsgens an einem Ort im Genom, in dessen Umgebung kein *ars*-Element vorhanden ist (z. B. *leu2*), führt zu einer 10-fachen Reduktion der H2A/lacZ RNA im Vergleich zu der Insertion am TRT1-Locus mit *ars*-Element. Die Regulation der Expression der genannten Histongene wird durch das *ars*-Element nicht beeinflusst. (Osley et al., 1986). Es ist möglich, daß das *ars*-Element - als allgemeiner Transkriptionsaktivator, jedoch nicht als regulatorische Sequenz - ebenfalls auf die Expression von AKY Einfluß hat. Die

Ergebnisse der Expression des AKY/lacZ-Fusionsgens, das als 'AKY-Promoter' lediglich den intergenischen Bereich zwischen HTA1 und AKY enthält, werden nämlich durch Northern Blot-Analysen mit AKY-spezifischen Proben bestätigt: U. Oechsner (pers. Mitteilung) konnte ebenfalls zeigen, daß AKY unabhängig von der C-Quelle, bzw. vom Vorhandensein oder Fehlen von Häm transkribiert wird. Der (intergenische) Promoterbereich des AKY-Gens wird zur Zeit intensiv untersucht. So konnte G. Strobel (pers. Mitteilung) zeigen, daß die Deletion eines 210 bp Sac II/Hsi I-Fragments (Pos. -200 bis -410, Abb. 18) die Expression des AKY/lacZ-Fusionsgens auf ein Zwanzigstel der ursprünglichen Aktivität reduziert. Der deletierte Bereich ist für eine nicht codierende Region in Hefe relativ GC-reich (annähernd 50%, s. II.8).

Die aus der DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz von YAK (Abb. 12), ist - mit Ausnahme der beiden, wahrscheinlich abgespaltenen, N-terminalen und der, ebenfalls post-translational modifizierten, C-terminalen Aminosäure - mit der veröffentlichten Primärstruktur des isolierten Proteins (Tomasselli et al., 1986) identisch. Chiu et al. (1967), Ito et al. (1980) und Tomasselli et al. (1986) identifizierten in Hefe lediglich eine einzige, durch proteinchemische Methoden nicht weiter auftrennbare, Adenylatkinaseaktivität. Daher wurde das aus der löslichen Fraktion kommerzieller Hefe präparierte YAK-Protein der cytoplasmatischen Version der Adenylatkinase (AK)-Familie zugeordnet. Andererseits wurde jedoch von anderen Arbeitsgruppen (Bandlow, 1972; Bandlow & Bauer, 1975; Daum et al., 1982) gezeigt, daß - analog zu höheren Eukaryonten - Hefe eine Adenylatkinase im Intermembranraum der Mitochondrien besitzt.

Die Isozyme der Adenylatkinasefamilie sind untereinander sehr verwandt (Abb. 13): 31 Aminosäuren (14.6%) sind in allen Spezies strikt konserviert. Unter diesen befinden sich 9 Glycin- und 3 Prolin-Reste, einen Hinweis darauf gebend, daß die Konservierung der Faltung des Proteins mindestens ebenso wichtig, wie die Primärstruktur für die Aktivität der Adenylatkinase ist. Am N-Terminus (Pos. 23-31 in Abb. 13) ist eine konservierte Region, der sogenannte

'flexible loop' lokalisiert: dieser umgibt den Phosphatrest des gebundenen AMP (in der cytoplasmatischen Adenylatkinase) (Pai et al., 1977). Ähnliche Sequenzen wurden auch in anderen Mononukleotid-bindenden Proteinen gefunden (Möller & Amons, 1985). Im 'flexible loop' sind sieben der neun Aminosäuren in allen Adenylatkinasen strikt konserviert, die Aminosäuren an den variablen Positionen entsprechen ausschließlich homologen Austauschen. Kristall-Bindungsstudien an AK1 aus Schwein (Pai et al., 1977) ergaben, daß die Aminosäuren Lys-29, sowie Arg-52, -105, -136, -140, -177 und -188 (Positionsangaben entsprechen der Numerierung in Abb. 13) an der Phosphatbindung beteiligt sind. Bis auf Arg-136 (an dessen homologer Position in den langen Varianten der Adenylatkinasen eine hydrophobe Aminosäure lokalisiert ist) sind diese Aminosäuren an entsprechenden Stellen konserviert. Die konservierten Aminosäuren enthalten sechs positive Ladungen, die wahrscheinlich die sechs negativen Ladungen der Phosphatgruppen von AMP und ATP (bzw. GTP) kompensieren. Die Bindungsstellen der Adenosin (bzw. Guanosin)-Reste des AMPs bzw. ATPs (GTPs) scheinen nicht hoch konserviert zu sein (Schulz et al., 1986).

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich, offenbart YAK die höchste Homologie zu AK2, das mitochondrial lokalisierte Isozym, bei Vergleich aller Mitglieder der AK-Familie untereinander. Der hohe Verwandtschaftsgrad dieser beiden Enzyme wird zudem durch die Tatsache dokumentiert, daß YAK mit AK2 verschiedener Organismen immunologisch kreuzhybridisiert, Antikörper gegen AK1, der cytosolischen Version höherer Eukaryonten, jedoch keine Reaktion mit YAK zeigen (Watanabe et al., 1985).

Der auffälligste Unterschied der cytoplasmatischen Adenylatkinase zu den übrigen ist das Fehlen eines aus 31 Aminosäuren bestehenden Sequenzblocks nahe dem C-Terminus des Proteins. Schulz et al. (1986) positionierten die Insertion der langen Formen der Adenylatkinasen (durch Einführung von mehr Lücken) an eine etwas andere Stelle als bei der Anordnung der verschiedenen Adenylatkinasen in der vorliegenden Arbeit (Abb. 13; s.a. Magdolen et al.,

1987). Dadurch wurde die extrem hohe Konservierung der Insertion zwischen YAK und AK2 (26 von 31 Aminosäuren sind identisch), sowie in etwas geringerem Maße zwischen den anderen langen Formen der Adenylatkinasen, nicht deutlich. Die Untersuchung der YAK-Kristallstruktur (Egner et al., 1987) bestätigt jedoch die wahrscheinliche Lage der Insertion bei den langen AK-Varianten wie in Abbildung 13 dargestellt. Die vermutlich eine β -Faltblattstruktur ausbildende Insertion verdeckt einen Teil der katalytischen Spalte, sie ist also in der unmittelbaren Nähe des aktiven Zentrums lokalisiert. Egner et al. (1987) vermuteten daher, daß die Insertion in den langen AK-Varianten für die Funktion dieser Enzyme eine Rolle spielt. Dies würde zwar den hohen Konservierungsgrad der Insertion erklären, aber nicht die Tatsache, daß die kurzen und die langen Varianten trotz dieser Unterschiede dennoch ähnliche Enzymkinetiken aufweisen. Aufgrund der ausgeprägten Homologie von AK2 mit YAK war es naheliegend zu vermuten, daß YAK die mitochondriale Variante der Hefe darstellt und die 31 Aminosäuren-Insertion das Signal - zumindest einen Teil davon - für die Lokalisierung des Proteins (in den Mitochondrien) enthalten könnte. YAK besitzt nämlich keine am N-Terminus liegende, abspaltbare, mitochondriale Präsequenz; diese trägt normalerweise die Information für den Import der meisten im Cytoplasma synthetisierten, mitochondrialen Proteine (Hay et al., 1984; Harmey & Neupert, 1985). Es gibt jedoch eine Reihe mitochondrialer Proteine, die kein Signalpeptid besitzen, z. B. Porin (Mihara et al., 1982), Iso-1- und Iso-2-Cytochrom c (Smith et al., 1970; Montgomery et al., 1980; Zimmermann et al., 1979; Harmey & Neupert, 1985), Cytochrom c-Hämlyase (Dumont et al., 1987), die Untereinheiten VIIa und VIII der Cytochrom c-Oxidase (Wright et al., 1986), der Adeninnukleotid-Translokator (Zimmermann et al., 1979; Zimmermann & Neupert, 1980) und die Isopropylmalat-Synthetase (Hampsey et al., 1983). Im Cytoplasma synthetisierte Proteine ohne Präsequenz können augenscheinlich in jedes der vier mitochondrialen Kompartimente (äußere und innere Membran, Intermembranraum, sowie Matrix) transportiert werden. Bei einigen dieser

Proteine konnte gezeigt werden, daß die mitochondriale Adresse im Inneren des Proteins codiert ist (Matsuura et al., 1981; Riezman et al., 1983; Stuart et al., 1987; Pfanner et al., 1987). Schon seit längerem wurde vermutet, daß AK2 höherer Eukaryonten ebenfalls keine abspaltbare Signalsequenz besitzt. W. Criss (1971) konnte zeigen, daß Mitochondrien (aus Rattenleber) in der Lage sind *in vitro* das (mature) isolierte AK2-Protein aufzunehmen. Ferner konnte *in vitro* (durch *in vitro*-Translation von Hühnerleber-(AK2)mRNA) hergestellte AK2 nicht von dem isolierten, maturen Protein durch SDS/Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterschieden werden (Watanabe & Kubo, 1982). Den endgültigen Nachweis für das Fehlen einer typischen Präsequenz in AK2 erbrachte die Sequenzierung von 'full length'-cDNA Klonen der Rinderadenylatkinase 2 (Kishi et al., 1987): das mature Protein ist lediglich um eine Aminosäure (Met) kürzer als die, von der DNA-Sequenz abgeleitete, Primärstruktur.

Die Disruption des AKY-Strukturgens ist in haploiden Zellen nicht letal, in Hefe muß also mindestens ein weiteres Protein vorhanden sein, das die zerstörte Enzymfunktion zumindest teilweise komplementieren kann. Die konstruierten *aky*-Mutanten weisen einen *pet*-Phänotyp auf, das AKY-Genprodukt scheint daher für den oxidativen Metabolismus in den Zellen essentiell zu sein. Die in dieser Arbeit beschriebene *aky*-Disruptante wurde durch Insertion des LEU2-Gens in den codierenden Bereich von AKY hergestellt. Eine zweite Disruptante, die - neben der Zerstörung des Leserahmens von AKY durch Insertion des LEU2-Gens nahe dem N-Terminus - eine Deletion des gesamten C-terminalen Anteils (151 von 222 AS von YAK) darstellt, weist den gleichen Phänotyp auf. Weiterführende Untersuchungen - mit einen gegen YAK gerichteten Antikörper, sowie enzymatische Tests -, die die intrazelluläre Lokalisierung von YAK klären sollten (Bandlow et al., 1988), ergaben ein überraschendes Ergebnis: in Proteinpräparationen sowohl des Cytoplasmas als auch von isolierten Mitochondrien aus Stämmen, die das intakte AKY-Gen enthalten, reagiert ein Protein (ca. 24 kD), das in beiden Fraktionen vorkommt, mit dem

Antikörper. Dieses Signal fehlt jedoch in beiden Kompartimenten, wenn der immunologische Test mit Proteinen aus den Disruptanten durchgeführt wird (Eine Verunreinigung eines der beiden Kompartimente in größerem Umfang mit Proteinen aus dem anderen wurde ausgeschlossen). Hefezellen, die das AKY-Gen auf einem multi-copy Plasmid enthalten, zeigen eine überexpression des 24 kD-Proteins, es liegt hierbei sowohl im Cytoplasma, als auch in Mitochondrien in erhöhten Konzentrationen vor. Das 24 kD-Protein kann in SDS/Polyacrylamid-Gelelektrophoresen hinsichtlich der Größe nicht von *in vitro* translatiertem YAK-Protein unterschieden werden (Bandlow et al., 1988).

Analog zu den immunologischen Tests kann - in Hefestämmen, die das intakte AKY-Gen tragen - sowohl in den Mitochondrien, als auch im Cytoplasma enzymatisch eine Adenylatkinaseaktivität nachgewiesen werden; in den Disruptanten ist keine Adenylatkinaseaktivität mehr in den Mitochondrien, aber auch eine Reduktion der Aktivität im Cytoplasma auf 10-20% zu beobachten (Bandlow et al., 1988). Diese Ergebnisse belegen zum einen, daß das YAK-Protein, entsprechend der präsequenzlosen AK2 höherer Eukaryonten, zumindest zum Teil in Mitochondrien transportiert wird, zum anderen, daß dieses Enzym in beiden Kompartimenten aktiv ist. Die Restaktivität im Cytoplasma der Disruptanten ist wahrscheinlich für die Komplementation des zerstörten AKY-Gens bei Wachstum auf vergärbarem Medium verantwortlich. Dieses cytosolische Isoenzym reagiert nicht mit dem gegen YAK gerichteten Antikörper. Um zwischen dem cytoplasmatischem Isoenzym und dem, zum Teil in den Mitochondrien lokalisierten, YAK-Protein zu unterscheiden, wurde das in dieser Arbeit untersuchte Gen, in Analogie zur AK2 höherer Eukaryonten, inzwischen als AKY2 bezeichnet (Bandlow et al., 1988).

TEIL III: ANALYSE DES KLONS pUHC15-2

1. Einführung

U. Oechsner (1986) isolierte und charakterisierte neben pUHC3-12 einen weiteren genomischen Klon der Hefegenbank, pUHC15-2, der ebenfalls ein potentieller Kandidatenklon für den Besitz eines hämregulierten Gens darstellte. Der in Hefe transkribierte Bereich des 3,7 kb Bam HI-Fragments wurde auf ca. 2.3 kb eingeeengt (Abb. 20A), in Northern Blot-Analysen hybridisierte das Insertfragment mit zwei verschiedenen rNA-Spezies (650 b, bzw. 1300 b). Die niedermolekulare rNA zeigte in diesen Untersuchungen keine Konzentrationsunterschiede in Abhängigkeit vom Wachstum auf verschiedenen C-Quellen, bzw. von der An-, oder Abwesenheit von Häm, während das längere Transkript in deutlich unterschiedlichen Konzentrationen, ähnlich dem CYC1-Transkript, aufzutreten schien. U. Oechsner vermutete daher, daß die beiden rNA-Spezies Transkripte zweier eng benachbarter, unterschiedlich regulierter Gene darstellen (1986). Mit Hilfe des genomischen Klons konnte U. Oechsner zu einem späteren Zeitpunkt einen cDNA-Klon (pMAC15) isolieren und durch Restriktionsanalyse die Lage und Transkriptionsrichtung eines der beiden Gene festlegen (Oechsner, 1986).

Das 3.7 kb Bam HI-Fragment des Klons pUHC15-2 wurde zunächst aus dem Hefe-*E. coli* Shuttlevektor YEpl3 isoliert, in pUC19 umklontiert (pUCU15-2) und durch Restriktionskartierungen weiter charakterisiert. Durch Spaltungen mit den Enzymen Pvu I, Eco RV, Bgl I, Ssp I, sowie Bam HI und Xho I (die Schnittstellen dieser letzten beiden Enzyme wurden bereits von U. Oechsner (1986) im Fragment kartiert), ergaben sich die in Abb. 19 gezeigten Bandenmuster. Durch weitere Restriktionsanalysen konnte die in Abb. 20A dargestellte Restriktionskarte des Insertfragments des Klons pUHC15-2 aufgestellt werden.

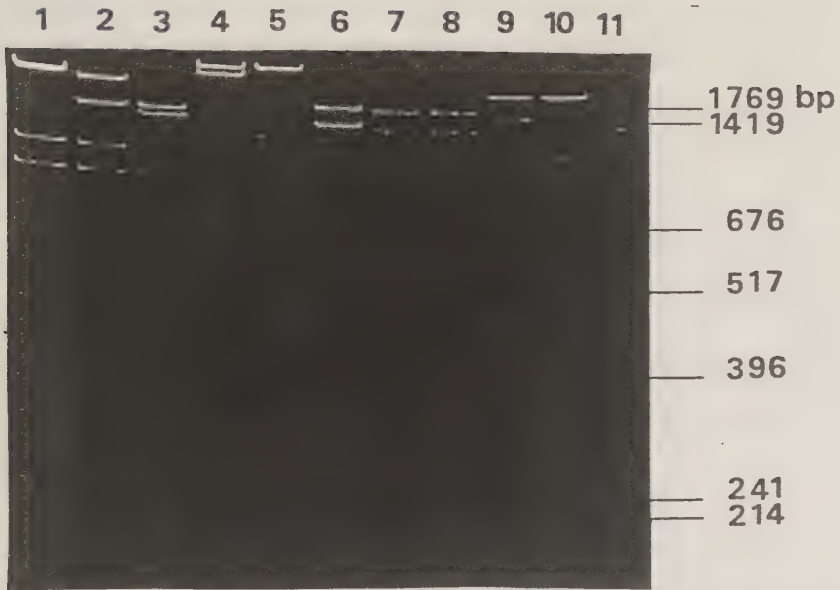


Abb. 19: Spaltungen von Klon pUCU15-2 mit verschiedenen Enzymen

Es wurden je ca. 5 µg Plasmid-DNA verdaut und anschließend auf einem 5%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. pUCU15-2 enthält das genomische 3.7 kb Fragment des Klon pUHC15-2 in der singulären Bam HI-Stelle des Vektors pUC19.

1) Pvu I, 2) Bam HI/Pvu I, 3) Bam HI/Pvu I/Xho I, 4) Bam HI/Xho I, 5) Bam HI/Xho I/Eco RV, 6) Marker (pUC19 x Rsa I + pUC19 x Taq I), 7) Bam HI/Xho I/Bgl I, 8) Bam HI/Bgl I, 9) Bam HI/Sep I, 10) Bam HI/Sep I/Eco RV, 11) Bam HI/Sep I/Bgl I

2. Analyse des linken Arms von pUHC15-2

2.1 Herstellung der Subklone und Sequenzierung des linken Arms von pUHC15-2. Identifizierung des Gens für Profilin

Der von U. Oechsner (1986) grob kartierte, in Hefe transkribierte Bereich von pUHC15-2 war auf zwei internen Hind II-Fragmenten enthalten (Abb. 20A). In diesem DNA-Abschnitt befindet sich lediglich eine Xho I-Stelle, diese liegt mitten in dem transkribierten Bereich von pUHC15-2, also wahrscheinlich in einer codierenden Region; daher wurde zunächst pUCU15-2 mit Xho I gespalten, die beiden resultierenden Fragmentbänder (860 bp, bzw. 2200 bp) subkloniert (pXX860, bzw. pXX2200) und die Region um die, im transkribierten Bereich von pUHC15-2 liegenden, Xho I-Stelle sequenziert. Tatsächlich wurde ein längerer offener Leserahmen (über 100 Aminosäuren) bei der Sequenzierung von pXX2200 gefunden. Es konnte aber anfangs kein dazugehöriges ATG-Startcodon im Anschlussklon pXX860 identifiziert werden. Da aber die aus dem offenen Leserahmen abgeleitete Aminosäuresequenz bei dem Abgleich mit den Datenbanken eine extrem hohe Homologie zu Profilin aus *Acanthamoeba* (Ampe et al., 1985) aufwies, wurde der Bereich um den offenen Leserahmen näher analysiert: hierzu wurden weitere Subklone hergestellt und schließlich von dem gesamten linken Anteil des Klons pUHC15-2 die DNA-Sequenz bestimmt (Abb. 20, 21 und 28).

Durch die Sequenzierung von überlappenden Fragmenten und von beiden Strängen konnten nun Sequenzierungsfehler ausgeschlossen werden, dennoch konnte dem offenen Leserahmen immer noch kein Startcodon zugeordnet werden. Erst die Überprüfung der DNA-Sequenz auf eine, in *S. cerevisiae* sehr selten auftretenden, Intronstruktur (Gallwitz et al., 1987) ergab den vollständigen Aufbau des Hefegens (PFY), das für Profilin, ein Aktin-bindendes Protein, codiert (Abb. 21).

```

-300 CACGAGGATTAGAGGAGACGTTACTTTGTTTATATATATTAGTATGTCAATCGCAAAGAAATGGAGTGATGACATGTTGTAGTATTTAGTATGA
-200 CTGTGTGGGAGGTTTACCATGATTTTTGGCGAGAACACGCCATGAAATGTCTTTGTACGAAACTCATTACCCGCATTAATATTTTTTTCTTTT
5' GGC
-100 CTCAGTTGACCCCTTCTCATTCCCTTCTTAAACAACTGTGTGATCCTTGAGAAAAGATAAATTACATACACAACATAAACCCCACTACGATCGC
M S W Q
1 ATG TCT TGG CAA G GTATGTGAACGAGACAATTATCAATTGATTAAGAAAGAAATGAGTCGGAGGTTAGCTTGTGTGACAAATGTTTGGCAA
96 GATTTTGTGTCATCGCGCTAATTTCAAGATTAAACCACTCAGAGTAAATTTACTAACTGGAATATCAAAAAACATATGAAATTTCAAACATGAAT
A Y T D N L I G T G K V D K A V I
196 CCGTMTTCTCTCTACTTTTAAACAG CA TAC ACT GAT AAC TTA ATA GGA ACC GGT AAA GTC GAC AAA GCT GTC ATC
S R A G D A V W A T S G G L S L Q P N E I G E I
276 TCG AGA GCA GGT GAC GCT GTT TGG GCT ACT TCT GGT GGC CTA TCT TTG CAA CCA AAC GAA ATT GGT GAA ATT
Q G F D N P A G L Q S N G L H I Q G Q K F M L L
351 CAA GGC TTC GAC AAT CCA GCT GGT TTG CAA AGC AAT GGT TTG CAT ATT CAA GGC CAA AAG TTC ATG TTG TTG
A D D R S I Y G R H D A E G V V C V R T K Q T V
426 GCT GAC GAT AGA AGT ATC TAC GGT AGA CAT GAT GCT GAG GGT GTT GTT TGT GTA AGA ACT AAG CAA ACC GTT
I A H Y P P T V Q A G E A T K I V E Q L A D Y L
501 ATT GCT CAT TAT CCA ACC GTA CAA GCC GGT GAG GCC ACC AAG ATT GTC GAG CAA TTG GCT GAC TAC TTG
G V Q Y *
576 GGT GTT CAA TAC TAA TTTATGCAGGTAAAGTTTCTTGCTTTATACACCCTATTCTGGCATCTCGGGGATTTGCGTCTCTATTTTACA
671 TTTATGTATGACGCTAATTATCACTGTAAAAGCGCAGCTTTTATATGTAGTCACATCCGGTATTTAACATATTTACGAAACAGTCTTAAAGAA
....CAATCA 3'
771 CATTTGATATACTTATGTTTAAATTTATCTACATATTACAATCATACGAGAAACACGCAAAAACAAATTAAGTCTTGAATCTTCGAAAGGAGACCAATT
871 GTACAACCCCTTTTTCGCCCTTTTCCCTTCGATATGTTATGTAGAGCTTCAAAGTCCTCAGTAGACAAAGTAAATATTTTCTGTTGCTTTGTGAT
971 GGGATTTCACAGATTTTGGCAAGACAACATAACCTCTTTGGACGTGCCAGCTAATAACAACGTGTCCGG

```

Abb. 21: DNA-Sequenz des Profilin-Gens (PFY) aus Hefe

Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist jeweils oberhalb der entsprechenden DNA-Sequenz angegeben. Das TATA-ähnliche Element, das Hexanukleotid CATAACA, die Konsensussequenzen der Hefeintrons und das potentielle Terminationssignal sind oberhalb der Sequenz durch Balken angedeutet. Majore Initiationsstellen sind durch geschlossene, minore durch offene Kreise gekennzeichnet. Das 5'-, bzw. 3'-Ende des cDNA-Klons ist oberhalb der genomischen Sequenz angegeben.

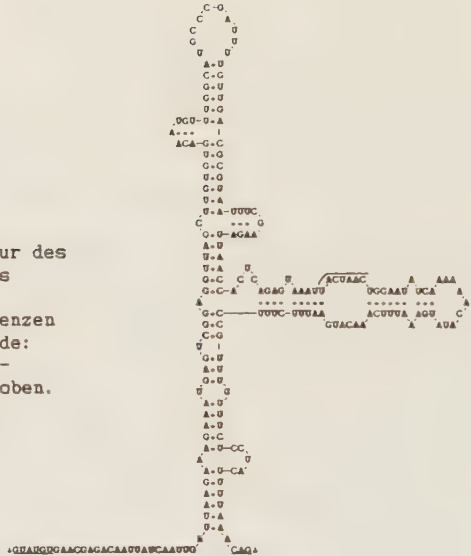
2.2 Das Intron des PFY-Gens

Die Analyse der DNA-Sequenz des PFY-Gens zeigt, daß dieses Gen ein 209 bp langes Intron nahe dem N-Terminus der codierenden Sequenz enthält: alle für Hefeintrons typische kanonische Motive, die für die Entfernung des intervenierender Sequenzen aus dem Primärtranskript notwendig sind, wurden auch im Intron des PFY-Gens nachgewiesen. Die Sequenzen der 5'-Donor-(4GTATGT) bzw. 3'-Akzeptorstellen (TTTTAAACAG+) entsprechen den Konsensusregeln, die für die Exon-Introngrenzen in Hefe aufgestellt wurden (Gallwitz et al., 1987; Schneider & Guarente, 1987). Die TACTAAC-Sequenz (Abb. 21, Pos. +145 bis +151), die in allen bis jetzt analysierten Hefeintrons 100% konserviert ist und an dessen letztem Adenin die Lariatbildung erfolgt (Domdey et al., 1984; Leer et al., 1984; Thompson-Jäger & Domdey, 1987) befindet sich 71 bp 5'-oberhalb der Akzeptorstelle in einem relativ großen Abstand im Vergleich zu anderen Hefeintrons (Tab. 7). Das erste AG Dinukleotid 3'-unterhalb der TACTAAC-Sequenz stellt den Spleißpunkt am 3'-Ende des Introns dar. Der 3'-Akzeptorstelle geht eine pyrimidinreiche Sequenz (26 von 28 Basen, Pos. +189 bis +216) voran.

Es ist möglich, das Intron zu einer ausgeprägten Sekundärstruktur zu falten ($\Delta G = -29.5$), wobei im PFY-Primärtranskript die TACTAAC-Sequenz ungepaart bleibt (Abb. 22). Newman (1987) konnte zeigen, daß die effiziente Entfernung des Introns aus dem Primärtranskript des ribosomalen Proteingens CYH2 unter anderem auch wahrscheinlich von der Sekundärstruktur des Introns abhängt. Die Deletion eines der komplementären Bereiche am 5'- bzw. 3'-Ende des Introns führt zu einer drastischen Verringerung der Prozessierung des Primärtranskripts (Newman, 1987).

Das Intron des PFY-Gens hat einen AT-Gehalt von 66% und codiert wahrscheinlich nicht für eine transwirkende Funktion, da der längste im Intron auftretende offene Leserahmen lediglich aus 29 Triplets besteht. Mit Ausnahme des MATa1-Gens, welches zwei Introns enthält (Miller, 1984), besitzen alle bis

Abb. 22: Mögliche Sekundärstruktur des Introns des PFY-Gens aus *S. cerevisiae*. Die Intronkonsensussequenzen (5'-Ende: GTATGT; 3'-Ende: PyAG, sowie die TACTAAC-Sequenz) sind hervorgehoben.



jetzt charakterisierten *Saccharomyces*-Gene höchstens ein Intron, das grundsätzlich nahe dem 5'-Ende des Primärtranskripts lokalisiert ist (Tab. 7). Dementsprechend enthält das 5'-Exon von PFY lediglich $4\frac{1}{3}$ Codons, sowie einen kurzen nichttranslatierten Leaderbereich (13 bis 41 Basen, abhängig von der benutzten Initiationsstelle; s. 2.4). Wie in anderen intronhaltigen Hefegenen (Leer et al., 1982) wird der offene Leserahmen in das Intron unmittelbar durch ein Stopcodon (TGA) blockiert.

2.3 Analyse des PFY-spezifischen cDNA-Klons pMAC15

U. Oechsner (1986) gelang es - während der Analyse des genomischen Klons - mit Hilfe des gesamten Insertfragments einen dazugehörigen cDNA-Klon aus einer Hefe-Expressionsbank (McKnight & McConaughy, 1983) zu isolieren. Durch Restriktionsanalyse konnte er nachweisen, daß der isolierte cDNA-Klon dem PFY-

Gen und nicht dem zweiten, auf pUHC15-2 codierten, Gen entspricht. Die Sequenzierung des PFY-spezifischen cDNA-Klons sollte - durch den Vergleich der genomischen DNA- mit der cDNA-Sequenz - den direkten Beweis für das Auftreten eines Introns im PFY-Gen liefern. Das cDNA-Fragment war in den Vektor pMAC561 inseriert und konnte nicht ohne Randsequenzen vollständig isoliert werden. Daher wurde in dieser Arbeit zunächst ein ca. 1100 bp großes Sph I/Eco RV-Fragment, das an beiden Enden noch Plasmidanteile des Vektors pMAC561 enthielt (am 5'-Ende des cDNA-Klons ungefähr 400 bp des ADC1-Promoters und am 3'-Ende 106 bp des CYC1-Terminators; McKnight & McConaughy, 1983), in pUC19 umkloniert (pC15). Ausgehend von pC15 wurden die in Abbildung 23C dargestellten Subklone hergestellt und das cDNA-Insert sequenziert (Abb. 23). Das 5'- und das 3'-Ende des cDNA-Klons ist in Abbildung 21 angedeutet. Die cDNA-Sequenz ist mit der genomischen Sequenz identisch mit Ausnahme der 5'-terminalen Base (s. 2.4) und der Abwesenheit des 209 bp langen Introns *exakt* zwischen den bereits aufgrund der Konsensusregeln für Hefeintrons bestimmten GT-Donor- und AG-Akzeptorstellen.

Die Sequenzierung des 5'-Endes des cDNA-Inserts ergab 5'-oberhalb der Insert-verknüpfstelle [(C)₁₆] im ADC1-Promoteranteil eine Ssp I-Schnittstelle. In der codierenden Region der PFY-cDNA befindet sich dagegen keine Ssp I-Stelle, die nächste folgt 78 bp 3'-unterhalb des Stopcodons des PFY-Leserahmens. Die codierende Region des cDNA-Klons konnte daher als 510 bp Ssp I-Fragment in den Vektor pGEM2 kloniert werden (pCOD26, Abb. 23). pGEM-Vektoren besitzen an jeweils einer Seite des Polylinkers den SP6-, bzw. T7-Promoter, erlauben also die *in vitro*-Transkription der diesen folgenden DNA-Sequenz. Mit Hilfe dieses Vektors konnte G. Müller in einem *in vitro*-Transkriptions- und Translationsversuch zeigen, daß der identifizierte offene Leserahmen tatsächlich translatiert und das resultierende Protein die vermutete Größe (126 Aminosäuren, s. 2.5) besitzt (Magdolen et al., 1988).

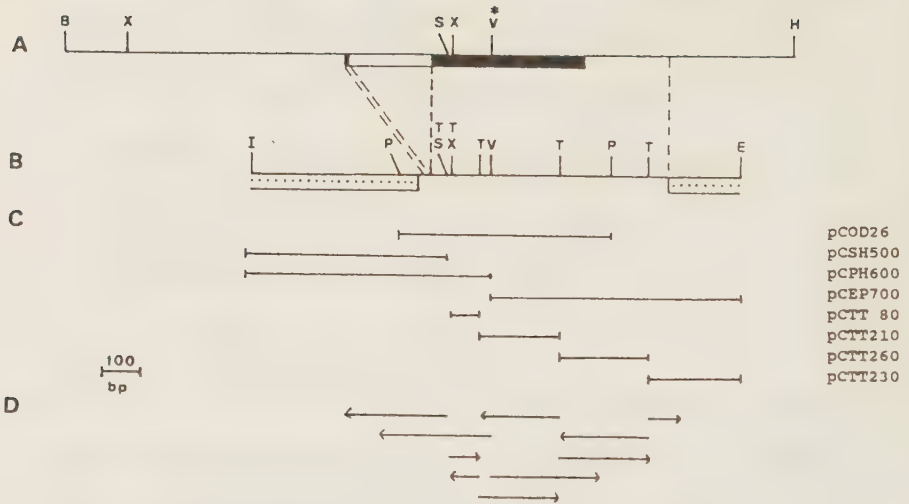


Abb. 23: Restriktionskarte und Sequenzierungsstrategie des cDNA-Klons pC15

A) Grobe Restriktionskarte des linken Arms des genomischen Klons pUHC15-2. Die Blöcke deuten das PFY-Gen (mit dem Intron) an. Mit * ist die Pvu II-Stelle markiert, die zur Gendisruption des PFY-Gens benutzt wurde. B) Restriktionskarte des cDNA-Klons pC15. Anteile des Vektors pMAC561 sind durch punktierte Blöcke angedeutet. Nur Restriktionsstellen, die zum Subklonieren benutzt wurden, sind gezeigt. C) Lage und Größe der hergestellten Subklone zum Sequenzieren des cDNA-Klons. D) Sequenzierungsstrategie: Richtung und Länge der durchgeführten Sequenzierungen sind durch Pfeile angedeutet. B, Bam HI; E, Eco RV; H, Hind III; I, Sph I; P, Ssp I; S, Sal I; T, Taq I; V, Pvu II; X, Xho I;

Gen	Intron- größe [bp]	Abstand der 5' Introngrenze zum Startcodon [Codons]	Abstand der TACTAAC- Sequenz zur 3' Intron- grenze [bp]
RP59	307	2	48
L17a	513	14	43
L25	415	4	40
S10-1	352	2	21
S10-2	394	2	36
L34-1	421	19	28
L34-2	349	19	29
S16A-1	390	6	34
S16A-2	551	6	33
RP28-1	447	37	23
RP28-2	429	37	39
L46	383	2	54
RP51-1	398	1	57
RP51-2	331	1	36
L29	510	16	42
RP29	458	- [Leader]	44
S31	312	- [Leader]	31
COX4	342	- [Leader]	48
COX5b	89	- [Startcodon]	30
MATa1	54	35	10
MATa1	52	[116]	9
KIN 28	81	9	25
ACT1	304	3	42
TUB1	115	8	40
TUB3	298	8	138
PFF	209	4	71

Tab. 7: Zusammenstellung aller bekannten intronhaltigen Kerngene aus der Hefe *Saccharomyces*

Neben der Größe ist die Lage des Introns im Gen (relativ zum Startcodon), sowie der Abstand der TACTAAC-Box zum 3'-Ende des Introns angegeben. Diese Zusammenstellung wurde mit Hilfe der Arbeiten Gallwitz et al. (1987), Cumsy et al. (1987), Schneider & Guarente (1987) und Schatz et al. (1986) erstellt.

2.4. Analyse der 5'- und 3'-flankierenden Region des PFY-Gens

Zwei TATA-ähnliche Elemente liegen bei Pos. -43 bis -36, bzw. Pos. -125 bis -118 (Abb. 21), die Bestimmung der 5'-Enden der *in vivo* gebildeten Transkripte (s.u.) macht wahrscheinlich, daß lediglich die am weitesten 5'-oberhalb gelegene Sequenz als TATA-Element wirkt: sie befindet sich 77-105 bp oberhalb der majoren Initiationsstellen in einem für Hefe typischen Abstand (Struhl, 1987). Diesem TATA-Element folgt unmittelbar eine pyrimidinreiche Sequenz (Pos. -118 bis -72; 55% T, 26% C). Ähnliche Sequenzen zwischen funktionalen TATA-Elementen und den Initiationsregionen der Transkription treten in einer Vielzahl von *S. cerevisiae*-Genen, z. B. CYC1, PGK, GAL1 und PYK, auf; diese pyrimidinreichen Blöcke legen wahrscheinlich die 5'-Grenze der Transkriptionseinheit fest (McNeil, 1988). Das Hexanukleotid CAPyACA, das in unmittelbarer Nähe des Startcodons mehrerer stark exprimierter Hefegene lokalisiert ist (Dobson et al., 1982), befindet sich bei Pos. -35 bis -30. Dieses kurze Sequenzmotiv, dessen Funktion unklar ist, tritt z. B. ebenfalls nahe den Initiationscodons der stark, bzw. moderat hoch exprimierten Gene HTA1 und AKY auf (diese Arbeit).

Die 5'-Enden der zellulären Profilin mRNA-Transkripte wurden durch Primerelongation bestimmt. Als Primer wurde ein Taq I-Fragment (Pos. +276 bis +358 in der genomischen DNA; das 3'-Ende des, zu der mRNA komplementären, Stranges befindet sich 67 b unterhalb des Startcodons) verwendet. Das endmarkierte Fragment wurde mit Gesamt-RNA aus glukosegewachsenen (sowie laktatgewachsenen; nicht gezeigt) Zellen unter stringenten Bedingungen inkubiert und die entstandenen RNA/DNA-Hybride mit reverser Transkriptase elongiert. Hierbei konnten keinerlei Unterschiede, weder hinsichtlich Zahl und Lage noch der Intensität der auftretenden Signale, zwischen den RNA-Populationen aus glukose-, bzw. laktat-gewachsenen Zellen festgestellt werden. Drei majore Startpunkte (Pos. -13, -17 und -41) wurden identifiziert (Abb. 21 und 24). Eine Überexposition des Autoradiogramms (nicht gezeigt) offenbarte

einige weitere minore Signale (Abb. 21). Multiple Initiationsstellen (mit unterschiedlichen Aktivitäten), sowie der kurze 5'-nichttranslatierte Leaderbereich der mRNA treten typischerweise in vielen anderen Hefegenen auf. Alle Initiationsstellen der PFY-Transkripte fallen mit einem A-Rest zusammen. Zusätzlich zu diesen nahe der codierenden Region von PFY liegenden Initiationsstellen trat ein weiteres Signal ungefähr 300 b oberhalb des Startcodons auf (Abb. 24). In Northern Blot-Analysen - durchgeführt mit Proben, die ausschließlich codierende Sequenzen des PFY-Gens enthielten - konnte ebenfalls häufig, neben dem Haupttranskript mit ca. 650 b, ein entsprechendes, schwaches Signal (ca. 900 b) beobachtet werden. U. Oechsner konnte hierbei durch Transkriptuntersuchungen an einer temperatursensitiven, spleißdefekten Hefemutante zeigen, daß das höhermolekulare Signal mit großer Wahrscheinlichkeit das noch nicht prozessierte Primärtranskript des PFY-Gens darstellt (Magdolen et al., 1988). Das ca. 300 b oberhalb des Startcodons beobachtete Signal bei der Bestimmung der 5'-Enden entspricht daher wahrscheinlich dem intronhaltigen Primärtranskript und nicht einer zusätzlichen, vom Startcodon weit entfernten Initiationsstelle des PFY-Gens. Das 5'-Ende des cDNA-Klons fällt auf die Pos. -8. Ein dieser Position entsprechendes Signal konnte jedoch bei den Primerelongationsversuchen nicht identifiziert werden. Die Base an dieser Stelle ist aber der einzige Unterschied (abgesehen vom Intron) zwischen der genomischen und der cDNA-Sequenz (genomisch: CGC; cDNA: GGC). Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß diese Nichtübereinstimmung auf einen Lesefehler der reversen Transkriptase - verursacht durch ein Zurückfallen des RNA-Templates ('snap-back') - zurückgeführt werden kann und daher die Pos. -8 keine Initiationsstelle darstellt. Die Sequenzanalyse des cDNA-Klons deckte auch eine mögliche Polyadenylierungsstelle auf: vor dem Poly(A)-Block des cDNA-Klons pC15 befindet sich das Dinukleotid CA, welches die bevorzugte Polyadenylierungsstelle in höheren Eukaryonten darstellt (Birnstiel et al., 1985). Henikoff et al. (1983) schlugen

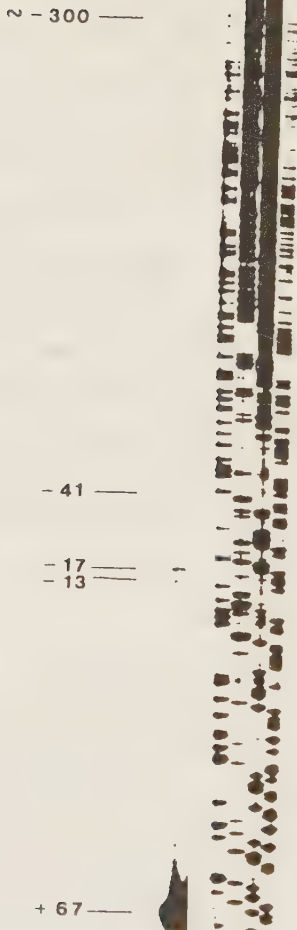


Abb. 24: Fragmentelongation zur Bestimmung der 5'-Enden der PFY-Transkripte
Spur 1, endmarkiertes 82 bp Taq I-Fragment, hybridisiert gegen Gesamt-RNA aus Hefewildtyp und elongiert mit reverser Transkriptase. Spuren 2-5, Nukleotidleiter einer bekannten Sequenz. Die 5'-Enden der Transkripte sind angedeutet.

für Hefe die Sequenz CAAT/GCITTTG als Terminationsstelle und Polyadenylierungssignal vor. Die ersten fünf Basen dieses Motivs sind mit den 3'-terminalen Basen (CAATC) des cDNA-Klons identisch. Das 3'-Ende der cDNA ist 223 bp unterhalb des Stopcodons des PFY-Gens lokalisiert (Abb. 21). 104 bp oberhalb des 3'-Endes liegt das Sequenzmotiv TTTTATATGT (Pos. +715 bis +736); dieses Motiv entspricht einem möglichen Terminationssignal der Transkription in Hefe (Tab. 3, Magdolen et al., 1987).

2.5. Analyse der abgeleiteten Proteinsequenz des PFY-Gens

Der Codierungskapazität des PFY-Gens entspricht ein Protein mit 126 Aminosäuren, dessen kalkuliertes Molekulargewicht 13340 beträgt. Die Codonauswahl weist eine relativ hohe Bevorzugung (CBI=0.67) von in Hefe häufig benutzten Tripletts auf. Nach Bennetzen und Hall (1982) deutet dies auf ein moderat hoch exprimiertes Gen, vergleichbar z. B. mit der Expression des AKY-Gens (CBI=0.66, diese Arbeit).

Die Computeranalyse der aus der DNA-Sequenz abgeleiteten Primärstruktur des Proteins stellte eine hohe Homologie zu den drei bekannten Profilin-Isoformen von *Acanthamoeba* (Ampe et al., 1985, 1988a) und - in geringerem Maße - zum Profilin aus Säugern (Ampe et al., 1988b) fest. Profiline sind kleine abundante, lösliche Proteine und gehören zu der großen (heterologen) Gruppe aktinbindender Proteine, die den Aufbau bzw. die Depolymerisation von Aktinfibrillen regulieren (Korn, 1982; Stossel et al., 1985; Pollard & Cooper, 1986): einige dieser Proteine (z. B. Fragmin und 'Severing' Proteine), bewirken durch Einlagerung und Zerkleinern der F-Aktinfibrillen den Abbau des Aktingerüsts, andere wiederum (z. B. Profilin und 'Capping' Proteine) verhindern die Polymerisation entweder durch Bindung an Aktinmonomere, wodurch diese aus dem zur Polymerisation verfügbaren G-Aktinpool entfernt werden oder durch Blockierung der Enden wachsender Aktinpolymere, wodurch das Anheften weiterer Aktinmono-

mere verhindert wird. Erste Untersuchungen ergaben, daß Profilin durch Bildung eines 1:1 Komplexes mit G-Aktin ('Profilactin') die Aktinnukleation inhibiert (Korn, 1982). Inzwischen konnte jedoch gezeigt werden, daß Profilin auch an das terminale Molekül eines wachsenden Aktinpolymers ('barbed end') binden kann und dadurch wahrscheinlich ebenfalls zur Regulation der Polymerbildung beiträgt (Pollard & Cooper, 1984).

Der Homologievergleich von Hefe-Profilin mit Profilin-Ia aus *Acanthamoeba* (68.5% identische (39.5%), bzw. homologe (29.0%) Aminosäuren an vergleichbaren Positionen), bzw. Profilin vom Kalb (25.3% identische und 18% homologe Aminosäuren) ist in Abbildung 25 wiedergegeben. Die drei Isoformen von *Acanthamoeba*-Profilin bestehen aus jeweils 125 Aminosäuren (ohne Met-Startcodon; $M_r \approx 13000$, also vergleichbar mit dem Hefeprotein [126 Aminosäuren mit Met-Startcodon, $M_r \approx 13340$]), Profilin von Kalb und Mensch aus 139 ($M_r = 14900$). Die *Acanthamoeba*-Isoformen Ia, Ib und II sind untereinander sehr ähnlich [Ia und Ib besitzen 94% identische Aminosäuren, Ia (bzw. Ib) und II 81.6% (bzw. 83.2%)], die Aminosäureaustausche sind hauptsächlich am Anfang des mittleren Drittels des Proteins lokalisiert (Ampe et al., 1988a). Die von dem Computerprogramm ALIGN (Barker et al., 1983, s.a. Tab. 5) bestimmten Homologiewerte betragen 32.6, 32.6 und 37.6 SD- (Hefe- gegen *Acanthamoeba*-Ia, Ib und II Profilin), bzw. - relativ geringe - 6.4 SD-Einheiten (Hefe- gegen Kalb-Profilin; Profilin von Kalb und Mensch sind sehr ähnlich, sie besitzen nur zwei nicht-homologe Aminosäureaustausche (Ampe et al., 1988b)). Die Sequenzhomologie zwischen dem Hefeprotein und den Isoformen von *Acanthamoeba* erstreckt sich über das gesamte Protein (besonders auffallend am N- und C-Terminus, und einem weiteren Block aus 10 aufeinanderfolgenden Aminosäuren am Ende des mittleren Drittels des Proteins), während das Säuger-Profilin mit diesen lediglich im N-Terminus eine ausgeprägte Homologie aufweist (Abb. 25A). Die C-terminalen 70% des Säuger-Profilins weisen jedoch - trotz des Fehlens der Sequenzhomologie - ein ähnliches Muster der Verteilung hydrophiler und hy-

A

ACA	-	T	W	Q	S	Y	V	D	T	N	L	V	G	T	G	A	V	T	Q	A	A	I	L	G	L	D	G	N	T	-
YSC	M	S	W	Q	A	Y	T	D	-	N	L	I	G	T	G	K	V	D	K	A	V	I	Y	S	-	R	A	G	D	A
BOV	A	G	V	N	A	Y	I	D	-	N	L	M	A	D	G	T	C	Q	D	A	A	I	V	G	Y	K	D	S	P	S

ACA	-	W	A	S	F	A	G	-	-	-	F	A	V	T	P	A	Q	G	T	T	L	A	G	A	F	N	N	A	D	A
YSC	V	W	A	T	S	G	G	-	-	-	L	S	L	Q	P	N	E	I	G	E	I	V	Q	G	F	D	N	P	A	G
BOV	V	W	A	A	V	P	G	K	T	F	V	N	I	T	P	A	E	V	G	I	L	V	G	-	-	K	D	R	S	S

ACA	I	R	A	S	G	F	D	L	A	G	V	H	Y	V	T	L	R	A	D	D	R	S	I	Y	G	K	K	G	A	A
YSC	L	Q	S	N	G	L	H	I	Q	G	Q	K	F	M	L	L	R	A	D	D	R	S	I	Y	G	R	H	D	A	E
BOV	F	F	V	N	G	L	T	L	G	G	Q	K	C	S	V	I	R	D	S	L	L	-	-	-	-	Q	D	G	E	

ACA	G	V	I	T	V	K	T	S	K	A	I	L	V	G	V	Y	N	E	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
YSC	G	V	V	C	V	R	T	K	Q	T	V	I	I	A	H	Y	P	P	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BOV	F	T	M	D	L	R	T	K	S	T	G	G	A	P	T	F	N	I	T	V	T	M	T	A	K	T	L	V	L	L

ACA	-	-	-	-	I	Q	P	G	T	A	A	N	V	V	E	K	L	A	D	Y	L	I	G	Q	G	F	-	-	-	-
YSC	-	-	-	-	V	Q	A	G	E	A	T	K	I	V	E	Q	L	A	D	Y	L	I	G	V	Q	Y	-	-	-	-
BOV	M	G	K	Q	G	V	H	G	G	M	I	N	K	K	C	Y	E	M	A	S	H	L	R	R	S	Q	Y	-	-	-

B

YSC Profilin	G	E	A	T	-	K	I	V	E	Q	L	A	D	Y	L	I	G
ACA Profilin	G	T	A	A	-	N	V	V	E	K	L	A	D	Y	L	I	G
PHY Cap42(a)	G	T	A	A	Y	K	T	V	E	-	L	D	D	Y	L	G	G
HUM Gelsolin	G	A	A	A	I	F	T	V	Q	-	L	D	D	Y	L	N	G

Abb. 25: Vergleich verschiedener Profiline und aktinbindende Proteine

A) optimale Anordnung der Aminosäuresequenzen von *Acanthamoeba*-Profilin Ia (ACA), Hefeprofilin (YSC) und Profilin vom Kalb (BOV). Identische Aminosäuren sind eingerahmt, homologe durch Punkte angedeutet. Homologe Aminosäuren sind: P, A, G, S, T; L, M, I, V; H, K, R; W, Y, F; Q, N, E, D.

B) Vergleich der 16 Aminosäure langen, homologen Sequenz von Hefe- und *Acanthamoeba* Profilin mit anderen F-Aktin bindenden Proteinen.

YSC, *Saccharomyces*; ACA, *Acanthamoeba*; PHY, *Physarum*; HUM, Mensch

drophober Aminosäuren zu *Acanthamoeba*-Profilin, also auch zum Hefeprotein, auf (Pollard & Cooper, 1986). Der C-Terminus des Hefeproteins weist, wie der von *Acanthamoeba* (Ampe & Vandekerckhove, 1987), eine 16 Aminosäure lange Homologie zu anderen F-Aktin bindenden Proteinen (*Physarum* cap42(a), bzw. humanes Gelsolin) auf (Abb. 25B).

2.6. Gendisruption von PFY

Das PFY-Gen liegt im haploiden Genom als 'single copy'-Gen vor (Magdolen et al., 1988). Die gezielte Inaktivierung dieser singulären Genkopie sollte also Aussagen darüber erlauben, ob das PFY-Genprodukt in Hefe lebensnotwendig ist bzw. ob das Fehlen von Profilin in den Zellen tolerierbar ist (Die motilen Einzeller *Acanthamoeba* und *Dictyostelium* besitzen z. B. ein hochredundant ausgelegtes Cytoskelettsystem: Der Ausfall eines akessorischen Proteins führt bei diesen Organismen selten zu einem beobachtbaren Phänotyp).

Für die Herstellung eines disrumptierten, nicht-funktionellen Allels wurde zunächst aus pUCU15-2 ein Subklon hergestellt, der das gesamte PFY-Gen trägt, jedoch nur eine singuläre Pvu II-Schnittstelle im Insertfragment enthält. Hierfür wurde pUCU15-2 mit Bam HI und Hind III gespalten, beide resultierenden, annähernd gleich großen (ca. 1700 bp) Bam HI/Hind III-Fragmente isoliert und in pUC19 inseriert. Der Klon, der das PFY-Gen trägt, wurde durch den Besitz der internen Pvu II-Stelle (pBHP1700) identifiziert (Abb. 20A). Der andere Klon, der den rechten Arm von pUHC15-2 enthält und zu einem späteren Zeitpunkt zur Gendisruption des zweiten auf pUHC15-2 liegenden Gens, GCY, verwendet wurde (diese Arbeit), besitzt keine Pvu II- aber eine interne Bgl II-Stelle (pBHG1700, Abb. 29). pBHP1700 wurde partiell mit Pvu II gespalten (neben der singulären Pvu II-Stelle im Insertfragment besitzt der Vektor pUC19 noch zwei weitere Pvu II-Stellen), das Fragmentgemisch gelelektrophoretisch aufgetrennt und die

linearisierte Form des Plasmids aus dem Gel eluiert. In den linearisierten Vektor konnte nunmehr ein 2300 bp Hpa I-Fragment, das das vollständige LEU2-Gen der Hefe enthält, ligiert werden. (Die Restriktion der DNA mit den Enzymen Pvu II und Hpa I erzeugt jeweils glatte Enden.) Das 2300 bp-Fragment stammte aus dem *E. coli*/Hefe-Shuttlevektor YEp13 (Abb. 17). Die Selektion der Plasmide, die das Fragment inseriert enthielten, erfolgte nach der in II.7. ausführlich beschriebenen Strategie. Die Plasmide der *E. coli*-Transformanten, die das LEU2-Gen (heterolog) exprimierten, wurden mit Bam HI und Hind III gespalten und solche Transformanten ausgewählt, die hierbei ein ca. 4000 bp (1700 bp Insert + 2300 bp LEU2-Fragment), sowie ein ca. 2700 bp (Vektoranteil) großes Fragment ergaben (ppfyV). Diejenigen Plasmide, die durch den Doppelverdau scheinbar nur linearisiert wurden (ca. 6700 bp), hatten das LEU2-Fragment in einer der beiden Pvu II-Stellen des Vektors pUC19 inseriert. Die Insertion des LEU2-Fragments unterbricht den PFY-Leserahmen bei [Aminosäure-] Pos. 54 in der N-terminalen Hälfte des Proteins. Nach Austausch des PFY-Wildtypgens durch das disrumpierte Allel sollte daher kein funktionelles Produkt gebildet werden. Das ca. 4000 bp-Insertfragment des Klons ppyfV wurde präpariert und (als lineares Fragment mit Wildtyp PFY-Sequenzen an beiden Enden) in die Hefestämme AH215 leu2 (haploid) bzw. AH22xAH33 leu2/leu2 ADE/ade2 (diploid) transformiert um durch homologe Rekombination (Rothstein, 1983) das mutierte Allel gegen das PFY-Wildtypgen auszutauschen. Im Falle des haploiden Stammes AH215 konnten keine Transformanten isoliert werden, die auf leucinfreiem Medium wachsen konnten. Einige diploide Transformanten wurden zunächst auf die stabile Integration des LEU2-Markers getestet. Anschließend wurde der Ort der Insertion des mutierten ppyf-Allels einer Transformante (PFYDO) durch genomische Southern Blot-Analyse bestimmt (Abb. 26). Zunächst wurde genomische DNA aus der Transformante PFYDO bzw. dem Wildtyp AH22xAH33 präpariert, mit Bam HI und Hind III verdaut, auf einem Agarosegel - mit den entsprechenden Kontrollplasmiden (pBHP1700, bzw. ppyfV, ebenfalls mit Bam HI und Hind III gespalten) - aufgetrennt und auf

Nitrozellulosepapier transferiert. Nach der Hybridisierung dieses Filters mit einer radioaktiv markierten, PFY-spezifischen Probe (510 bp Ssp I-Fragment des cDNA-Klons pC15, s.o.) zeigt das Autoradiogramm (Abb. 26), daß das Signal des disrumptierten PFY-Gens von der Wildtypposition (bei ca. 1700 bp) zu der erwarteten Position (bei ca. 4000 bp) verschoben wird, während das zweite, dem nicht zerstörten PFY-Allel entsprechende Signal der diploiden Transformante PFYDO auf der Höhe der Wildtypbande verbleibt. Die anschließende Hybridisierung des Filters mit einer LEU2-spezifischen Probe wies nach, daß eines der beiden auftretenden Signale mit dem des disrumptierten Allels identisch ist (bei ca. 4000 bp). Das zweite entspricht den leu2-Allelen des Empfängerstammes (nicht gezeigt).

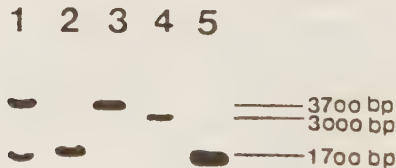


Abb. 26: Nachweis der Disruption des PFY-Gens

Genomische Hefe-DNA der LEU⁺-Transformante PFYDO, der diploide Empfängerstamm AH22x33, sowie Plasmid-DNA (pBHP1700, ppfyV) wurden mit Bam HI und Hind III gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt, auf NC-Papier transferiert und mit einem radioaktiv markiertem PFY-spezifischen 510 bp Ssp I-Fragment hybridisiert. Spur 1, DNA der Disruptante PFYDO; Spur 2, diploider Wildtypstamm AH22x33; Spur 3, ppfyV (disrumptiertes Kontrollplasmid); Spur 4, ppfySS (disrumptiertes Kontrollplasmid, durch Austausch eines Sal I-Fragments (Pos. -508 bis +258 des PFY-Gens) mit einem LEU2-Fragment entstanden, Herstellung nicht gezeigt); Spur 5, pBHP1700 (nicht disrumptiertes Ausgangsplasmid)

Das Fehlen haploider Transformanten ließ bereits vermuten, daß die Inaktivierung von PFY letal für die Hefezelle wirkt. Um dies zu beweisen, wurden Zellen des diploiden Stammes PFYDO sporuliert und die Asci zerlegt (Abb. 27): alle untersuchten Asci enthielten lediglich jeweils 2 lebensfähige Sporen, diese konnten ausnahmslos nicht auf leucinfreiem Medium wachsen (d.h. sie enthalten nicht das LEU2-Gen, das PFY-Gen ist daher nicht disruptiert). Die rezessive Letalität beweist, daß das von PFY codierte Protein für das Leben und/oder das Wachstum der Zelle unbedingt erforderlich ist: in Hefe existiert kein weiteres (ähnliches) Protein, das die Funktion von Profilin ersetzen kann.

Die Transformation von pUHC15-2 (im 'multi-copy'-Vektor YEpl3) in Hefe offenbart keinen Phänotyp, obwohl hierbei das PFY-Gen in multipler Kopienzahl in der Zelle vorliegt. Die Überexpression des Aktins (und auch des α -Tubulins) wirkt im Vergleich dazu letal (Rose et al., 1987).

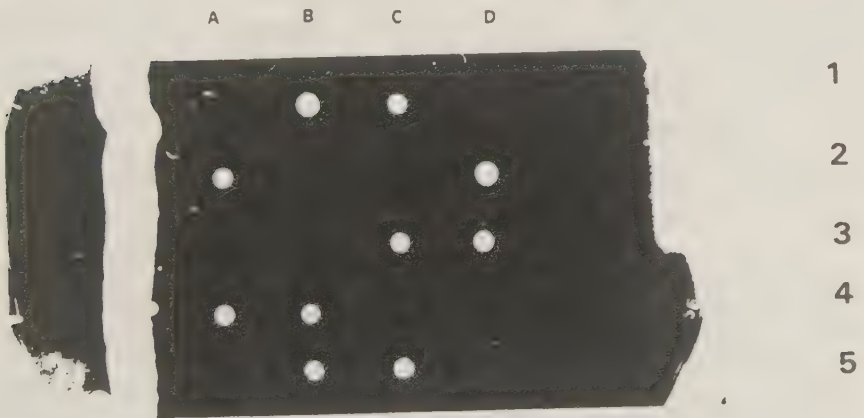


Abb. 27: Die Analyse von 5 Asci nach Sporulation der diploiden Disruptante PFYDO MAT α /MAT α PFY/pfy::LEU2 leu2/leu2 ADE/ade2 enthält eines der Allele des PFY-Gens durch die disruptierte Version des Plasmids ppfyV ersetzt.

2.7. Konstruktion eines PFY/lacZ-Fusionsgens und

Untersuchung der Expression in Hefe

Das PFY-Gen enthält nahe dem N-Terminus der codierenden Sequenz (Pos. +14 bis +222 mit dem Startcodon ATG als Pos. +1) ein Intron. In dem Bereich von Pos. +1 bis Pos. +18 ist keine Restriktionsstelle vorhanden, das 7. Codon stellt bereits ein - im Intron liegendes - Stopcodon dar (Abb. 21). Unmittelbar vor dem Startcodon (Pos. -12) befindet sich jedoch eine Pvu I-Schnittstelle. Bei der Konstruktion des PFY/lacZ-Fusionsgens wurde daher ein 501 bp Pvu I/Sal I-Fragment (Pos. -12 bis -513) als 'Promoterfragment' verwendet. Auf diesem sind sämtliche Initiationsstellen der Transkription, das präsumptive TATA-Element und das Hexanukleotid CATACA, sowie annähernd der gesamte, in einem relativ großen Abstand 5'-oberhalb des PFY-Gens lokalisierte, Mbo II-Cluster (Pos. -320 bis -554; s. 2.8.) vorhanden. Das Promoterfragment enthält jedoch kein ATG-Startcodon, dieses muß daher vom lacZ-Gen mitgebracht werden. Im Laufe der Konstruktion der rDNA/lacZ-Fusionsgene (s. I.3.) wurde ein geeigneter Vektor (pUClacZATG) hergestellt: dieser pUC19-Abkömmling enthält das gesamte lacZ-Gen - mit Ausnahme der sieben N-terminalen Aminosäuren -, an dessen N-Terminus ein artifizielles ATG-Startcodon konstruiert wurde. pUClacZATG wurde mit Sph I (Schnittstelle liegt 13 bp 5'-oberhalb des ATG-Startcodons des lacZ-Leserahmens) linearisiert und die 3'-überhängenden Enden des Fragments mit Hilfe der T₄ DNA-Polymerase in glatte Enden überführt. Das isolierte Pvu I/Sal I-Promoterfragment wurde ebenfalls mit T₄ DNA-Polymerase inkubiert und in den dephosphorylierten Vektor inseriert. Die Orientierung des Fragments in den Subklonen wurde durch die, asymmetrisch im Fragment liegende, Hind II-Stelle (81 bp 5'-oberhalb der Pvu I-Stelle) nachgewiesen (nicht gezeigt): In pUC(PFYsyn) entspricht die Orientierung des Fragments zum lacZ-Gen derjenigen des Fragments zum PFY-Gen *in vivo*, während pUC(PFYanti) das Promoterfragment umgekehrt inseriert enthält. Der Übergang der Promoter/lacZ-Fusionen wurde

nicht sequenziert (wie bei allen anderen in dieser Arbeit hergestellten lacZ-Fusionen), da die PFY/lacZ-Fusion keine 'in frame'-Fusion aus codierenden Sequenzen darstellt. Zudem zeigte die Restriktionsanalyse der Plasmide, daß die fusionierten Fragmente die erwarteten Größen ergaben. Eine Verkürzung des lacZ-Gens, bzw. des Promoterfragments in einem größerem Umfang durch Nukleasen war daher ausgeschlossen. Sowohl pUC(PFYsyn) als auch pUC(PFYanti) wurden mit Hind III und Sma I gespalten, die Fusionsgene als ca. 3,5 kb große Fragmente isoliert und in den Hefe/*E. coli*-Shuttlevektor YEp 13 (Abb. 17) kloniert (YEp 13 war hierzu mit Hind III sowie partiell mit Eco RV gespalten worden.). Transformanten wurden auf Ampicillin-Resistenz und Tetrazyklin-Sensitivität selektiert und durch Restriktionsanalyse untersucht: YEp(PFYsyn) und YEp(PFYanti) ergaben die, für die Klonierung in die Eco RV-Stelle des Tetrazyklings, sowie der ca. 300 bp davon entfernten Hind III-Stelle, erwarteten Fragmentmuster. Die beiden Plasmide wurden schließlich in den Hefestamm TO2 hem 1-1 leu2 (Strobel et al., 1988) transformiert und auf Komplementation des leu2-Defekts durch das, auf dem Vektoranteil von YEp13 codierte, LEU2*-Gen selektiert. Der Nachweis der Transformation der 'multi-copy' Plasmide erfolgte zum einen durch Reisolierung der Plasmide aus Hefe, zum anderen durch Überprüfung der Cosegregation des LEU2*-Phänotyps und des lacZ-Fusionskonstrukts einiger Hefetransformanten nach mehrtägigem Wachstum in nicht-selektivem Medium (nicht gezeigt).

Die Expression des PFY-Gens scheint unabhängig von der dargebotenen C-Quelle zu erfolgen: die gemessenen β -Galaktosidaseaktivitäten unterschieden sich nur geringfügig, wenn die Hefetransformanten auf verschiedenen C-Quellen (Glukose, Galaktose sowie Glyzerin) gezüchtet worden waren. Es traten auch keine signifikanten Unterschiede auf, wenn die Expression des Fusionsgens (in hämfrei gewachsenen Zellen) in Gegenwart bzw. Abwesenheit des Häm-analogs Deuteroporphyrin IX getestet wurde. In stationären Zellkulturen wurden nur geringfügig höhere β -Galaktosidasewerte als in Zellen, die sich in der

logarithmischen Phase befanden, beobachtet. Diese Ergebnisse deuten das Fehlen einer Zellzykluskontrolle des PFY-Gens an und lassen vermuten, daß das Profilin-Gen - ähnlich dem Aktin-Gen - in Hefe konstitutiv exprimiert wird (Transkriptionsstudien des PFY-Gens führten zu vergleichbaren Resultaten (Magdolen et al., 1988)). Die gemessenen β -Galaktosidaseaktivitäten des PFY/lacZ-Fusionsgens sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Plasmid	Wachstums- bedingung	C-Quelle		
		Gal	Glu	Gly
-	+ALA	0	0	0
YEp13	+ALA	0	0	0
YEp13 (PFYsyn)	+ALA/STAT	25.3	n. t.	n. t.
YEp13 (PFYsyn)	+ALA	17.6	18.5	16.8
YEp13 (PFYsyn)	-ALA/-DIX	13.0	n. t.	n. t.
YEp13 (PFYsyn)	-ALA/+DIX	12.6	n. t.	n. t.
YEp13 (PFYanti)	+ALA	0.3	0.3	n. t.

Tab. 8: β -Galaktosidaseaktivitäten der PFY/lacZ-Fusionsgene in dem Hefestamm T02

Die angegebene β -Galaktosidaseaktivität (in U/ml; Miller (1972)) entspricht dem Durchschnitt aus vier Experimenten. Gal, Galaktose; Glu, Glukose; Gly, Glyzerin. Der Hefestamm T02 wurde entweder mit δ -Aminolävulinat supplementiert (+ALA), oder Häm-frei gezüchtet (-ALA/-DIX). Eine etwaige Häm-abhängige Expression wurde 4 h nach Zugabe von 10 μ M Deuteroporphyrin IX zu hämfrei gewachsenen Zellen überprüft (-ALA/+DIX). Die Messungen wurden mit logarithmisch wachsenden Zellkulturen durchgeführt (OD_{660} : ca. 0.6), mit Ausnahme der gekennzeichneten Versuchsreihe (+ALA/STAT): hierbei wurden stationäre Zellkulturen verwendet. n. t. = nicht geprüft.

Im Vergleich zu den Expressionsraten des AKY/lacZ-Fusionsgens (Tab. 6) sind die des PFY/lacZ-Gens um ungefähr einen Faktor 10 niedriger, die Transkriptionsraten der Gene AKY und PFY sind jedoch *in vivo* miteinander vergleichbar (U. Oechsner, pers. Mitteilung). Diese Beobachtung wird auch durch die CBI-Werte der beiden Gene (AKY = 0.66; PFY = 0.67) - die eine Abschätzung der Expressionsrate des jeweiligen Gens erlauben (Sharp et al., 1986) - unterstützt. Ein Grund für die relativ geringe Expression des PFY/lacZ-Gens kann die artifizielle ATG-Startcodonumgebung des Fusionsgens darstellen. In der Startcodonumgebung von Hefegenen ist an Pos. -3 in der überwiegenden Mehrzahl ein Purin (meist ein A), an Pos. +6 ein Pyrimidin (meist ein U) lokalisiert (Dobson et al., 1982); der Bereich vor dem ATG-Startcodon ist sehr A-reich und G-arm, das Codon nach dem Startcodon weist eine deutliche Präferenz für ein Serincodon (UCPy) auf (Hamilton et al., 1987). Vier der sechs Basen vor dem Startcodon des PFY/lacZ-Fusionsgens als auch die drei Basen des zweiten Codons des Leserahmens sind G-Reste (Tab. 9). Die Startcodonumgebung weicht also extrem von dem optimalen Sequenzkontext des ATG-Startcodons in Hefegenen ab. Dies führt wahrscheinlich zu einer geringeren Translations-effizienz der gebildeten mRNA und den niedrigen beobachteten β -Galaktosidase-aktivitäten des PFY/lacZ-Fusionskonstrukts.

Das Fusionsgen, das das Promoterfragment in der anderen Orientierung enthält [YE_p(PFYanti)], zeigte zwar eine äußerst geringe, aber signifikante Expressionsrate: während die durchgeführten Kontrollexperimente (Stamm TO2 ohne Plasmid; TO2 mit dem Vektor YE_p13; TO2 mit YE_placZ [enthält das lacZ-Gen mit einem ATG-Startcodon, jedoch ohne Promoter, s. I.3]), wie erwartet, keine β -Galaktosidaseaktivität in den jeweiligen Hefestämmen offenbarte, konnte im Falle von TO2 mit YE_p(PFYanti) eine Aktivität von 0.3 U/mg Gesamtprotein (entspricht ca. 1-3% der Aktivität von YE_p13(PFYsyn)) gemessen werden (Tab. 8). Scheinbar führt die Bindung von Proteinen des Transkriptionsapparates (z. B. RNA Polymerase II) an den Promoterbereich des PFY-Gens zu der

- wahrscheinlich unspezifischen - geringen Transkription des anderen Stranges in diesem Bereich.

A)	A T NNATGNN G C
B)	A A A T A A AATGTC T C C C
C)	
PFY	<u>CAAATTATGTCT</u>
ORFre	<u>AAGGTCATGTCC</u>
GCY	<u>AGAAAAATGCCCT</u>
AKY	<u>ACAGTAATGTCT</u>
HTA1	<u>TATAAAATGTCC</u>
PFY/lacZ bzw.	
rDNA/lacZ	GCAGGCATGGGG

Tab. 9: Vergleich der Sequenzen in der Startcodonumgebung verschiedener Gene mit den vorgeschlagenen Konsensussequenzen in Hefe
A) Die bevorzugten Basen an Pos. -3 und Pos. +6 stellen in Hefe ein Purin, respektive ein Pyrimidin dar (Dobson et al., 1982). B) Konsensussequenz hochexprimierter Gene (Hamilton et al., 1987). C) Startcodonumgebungen der in dieser Arbeit analysierten Gene. PFY = Profilin-, AKY = Adenylatkinase-, HTA1 = Histon H2A-1-Gen. GCY und (möglicherweise auch) ORFre sind Hefegene, deren Funktion bislang unbekannt sind (s. III.3). PFY/lacZ und rDNA/lacZ sind die in dieser Arbeit mit einem artifiziellen ATG-Startcodon konstruierten Promoter(Hefe)/lacZ-Fusionsgene. Die mit dem Konsensus hochexprimierter Gene übereinstimmenden Basen sind unterstrichen.

2.8. Der Mbo II-Cluster in der 5'-flankierenden Region des

PFY-Gens

Die Sequenzanalyse von pUHC15-2 wurde schließlich bis zur Bam HI-Schnittstelle, d.h. bis zum ('linken') Ende des Insertfragments, durchgeführt (Abb. 20). Hierbei konnten der bereits bekannten Sequenz weitere 400 bp hinzugefügt werden; insgesamt wurden 709 bp der 5'-flankierenden Region des PFY-Gens bestimmt (Abb. 28).

In der Region von ca. Pos. -300 bis Pos. -700 ist eine extreme Purin/Pyrimidin-asymmetrie zu beobachten, über 70% der Basen (des 'nichtcodierenden' Stranges) sind Purine. Die Computersuche nach 'direct repeats' (Microgenie, Beckmann Instruments) offenbart eine große Anzahl homologer 27 bp-Wiederholungen in dem Bereich von Pos. -320 bis Pos. -553 (nicht gezeigt). Diese 27 bp-Kassetten sind ihrerseits aus Triplets mit dem Konsensus GAN aufgebaut, wobei die dritte Base ebenfalls eine deutliche Präferenz für ein Adenin aufweist. Dies resultiert in der auffälligen Anhäufung von Mbo II-Schnittstellen (Erkennungssequenz: GAAGA); in dem Bereich von Pos. -300 bis Pos. -700 treten insgesamt 18 Mbo II-Stellen auf (zum Vergleich: die restlichen 3.3 kb des Insertfragments von pUHC15-2 enthalten lediglich 8 weitere, über den ganzen Bereich verteilte, Mbo II-Schnittstellen). Die Region zwischen Pos. -320 und Pos. -553 hat einen Purinanteil von 76.1% (43.2% A; 32.9% G; 13.7% T; 10.3% C), die Dinukleotide GA (21.9%), AG (17.6%) und AA (16.7%) entsprechen 56.2% aller sechzehn Dinukleotide in diesem Bereich.

Polypurin/Polypyrimidin-Bereiche treten in höheren Eukaryonten häufig auf (Birnbom et al., 1979) und sind in vielen Fällen sensitiv gegenüber der Einzelstrang-spezifischen S1-Nuklease (Cantor & Efstratiadis, 1984). Diese Regionen bilden möglicherweise eine andere als die normale B-Konfiguration der DNA aus. Das zirkuläre Plasmid pTHS200 (Abb. 20C), das ausschließlich Sequenzen der purinreichen Region (Pos. -310 bis -511) inseriert enthält, wurde daher auf

S1-Nukleasesensitivität (im Vergleich zu pUC19) getestet. Es konnten hierbei keine signifikanten Unterschiede zwischen pTHS200 und dem Kontrollplasmid festgestellt werden (Lang, Trommler und Magdolen, unveröffentlichte Ergebnisse), eine ausgeprägte S1-Nukleasesensitivität tritt in diesem Bereich nicht auf.

Die purinreiche Sequenz 5'-oberhalb des Profilingens codiert aber auch für einen offenen Leserahmen (ORF1). Dieser beginnt im Insertfragment (mit der Bam HI-Stelle) an Pos. -708 mit einem Asparaginsäurecodon, d.h. der N-Terminus des präsumptiven Proteins (mit dem Startcodon) läge außerhalb des klonierten Fragments. Er endet an Pos. -291. Die Codierungskapazität des partiellen Leserahmens (139 Aminosäuren) entspricht einem Protein mit dem Molekulargewicht von 16700. Aufgrund des hohen Puringehalts der DNA weist das potentielle Protein einen extrem hohen Gehalt an geladenen Aminosäuren auf (40.0% Asp + Glu [Codons: GAN]; 19.3% Lys + Arg [Codons: AAPu, bzw. ACPu]. Die Codonauswahl weist keine Präferenz für in *Saccharomyces* bevorzugte Triplets auf. Ein - dem ORF1 entsprechendes - Transkript konnte nicht nachgewiesen werden (U. Oechsner, pers. Mitteilung). Die Musterung von Protein-datenbanken ergab zunächst recht gute Homologien zu mehreren eukaryontischen Proteinen, z. B. zu α -Prothymosin aus Ratte (22% identische Aminosäuren), Ubichinol:Cytochrome c-Oxidoreduktase Untereinheit VI aus Hefe (29%) und das HMGI-Protein aus Kalbsthymus (21%) (Watson & Dixon, 1981; van Loon et al., 1984; Haritos et al., 1985). Diese Proteine weisen ebenfalls einen extrem hohen Anteil an sauren, bzw. basischen Aminosäuren auf. Die Durchführung des ALIGN-Programms (Barker et al., 1983) zur optimalen Anordnung der Proteine mit ORF1 ergibt jedoch SD-Werte die unter 4.0 liegen, die Proteine weisen keine statistisch absicherbaren Homologien zueinander auf. Der besondere Aufbau der Region im Bereich von ca. Pos. -300 bis -700 [(GAA)_n] könnte also zufällig einen längeren, nicht für ein Protein codierenden, Leserahmen generieren.

```

      D P E V E K K E L E R K Q S Q I L R D
-709 G GAT CCT GAA GTG GAA AAG AAG GAG TTA GAG AGA AAG CAA AGC CAG ATT TTA AGA GAC

      R R R R Q L K E K E K Q E S P D A A F E
-651 AGA AGG AGA AGA CAG CTC AAA GAA AAG GAG AAA CAA GAA TCC CCA GAT GCC GCT TTT GAG

      T G F R K Q N S P T T Y G A S R R N E Y
-591 ACG GGA TTT AGA AAG CAA AAT TCA CCC ACT ACC TAT GGA GCC TCG AGA AGA AAT GAA TAT

      E E D D F L V D D D E E E E A A F D D E
-531 GAA GAA GAT GAC TTT TTA GTC GAC GAC GAT GAG GAA GAG GCT GCG TTT GAC GAC GAA

      E D D N E E E E E E D A D E E N A S R
-471 GAG GAT GAT AAT GAG GAA GAA GAA GAA GAG GAC GCG GAT GAA GAG AAC GCC TCT CGT

      L R N L K R E G A A M Y R E E E E E E K
-411 CTA AGA AAT TTA AAA AGA GAA GGA GCA GCA ATG TAC AGA GAA GAG GAA GAA GAA AAA

      D R S E T K R R R V A V I E D D E D E D
-351 GAT AGC AGC GAG ACA AAA AGA AGA AGG GTT GCG GTC ATC GAG GAC GAC GAA GAC GAG GAT

      *
-291 TAG AGGAGACGTTACTTTGTTTATATATATTAGTATGTACAATCGCAAAGAAATGGAGTGATGACATGTTGTAGTATT

-212 AGTATGAGGTTACTGTGTTGGGAGGTTTTACCATGATTTTTGGCGGAGAACACGCCATGAAATGCTTTGTACGAAACTCAT

-132 TACCCGCATTAAATATTTTTTTCTTTTAAAGCTCAGTTGACCCCTTCTCATTCCCTTCTTAAACAACGTGTGTATCCT

      M S W Profilin (PFY)
-52 TGAGAAAAGATAAATTACATACACAACATAAACCCAACTACGATCGCAAATT ATG TCT TGG ... ..

```

Abb. 28: Die 5'-flankierende Sequenz des PFY-Gens

Die Sequenzanalyse 5'-oberhalb des PFY-Gens wurde bis zur Bam HI-Schnittstelle des Insertfragments von pUHC15-2 fortgeführt. Die presumptive Aminosäuresequenz des, in das Fragment hineinlaufenden, offenen Leserahmens ORF1 und der N-Terminus des PFY-Gens ist jeweils oberhalb der entsprechenden DNA-Sequenz angegeben.

Eine Disruption dieser Sequenz (und anschließende homologe Rekombination des Fragments in Hefe) wurde nicht durchgeführt, da bei einem etwaig beobachbarem Phänotyp nicht unterschieden werden kann, ob dieser auf die Zerstörung eines potentiellen 'Upstream'-Elements des PFY-Gens oder auf die Zerstörung des für ein Protein codierenden Leserahmens ORF1 beruht. Eine Klärung dieser Frage kann zum einen durch die Isolierung eines genomischen Anschlußklons, eine Erweiterung der Sequenzanalyse in Richtung des potentiellen N-Terminus von

ORF1i und etwaige Promoteruntersuchungen von ORF1i erhalten werden. Zum anderen könnten Promoterverkürzungen des PFY/lacZ-Fusionsgens und Testen der resultierenden β -Galaktosidaseaktivitäten in Hefe Aufschluß über eine mögliche Funktion des Mbo II-Clusters in der Expression des PFY-Gens erbringen. Derartige Sequenzen wurden bislang noch nicht als cis-wirksame regulatorische Elemente in Hefe identifiziert.

2.9. Diskussion

Aktin ist ein abundantes, hoch konserviertes Protein, tritt in allen eukaryontischen Zellen auf und besitzt - zumindest zum Teil - die selben Funktionen in Hefe und (Nichtmuskel-)Vertebratenzellen: Aktin ist einerseits eine Hauptkomponente des kontraktilen Rings, der für die Schwesterchromatidentrennung während der Mitose verantwortlich ist, trägt aber vor allem zum Aufbau des Cytoskeletts bei. Das dreidimensionale Aktingerüst stellt die strukturelle Basis für die Zellmorphologie und -bewegung, für den intrazellulären Transport, sowie für Exo-, bzw. Endozytose dar (Korn, 1982; Weeds, 1982). Das mikrofibrilläre Aktingerüst wird, entsprechend der dualen Funktion in Interphase- und mitotischen Zellen, auch in *Saccharomyces*, gebunden an den Zellzyklus auf-, bzw. umgebaut: vor der S-Phase kommt es zu einer Depolymerisierung der F-Aktinfilamente. Während der Mitose (Anaphase) wird der kontraktile Ring aus dem G-Aktinpool gebildet und in den beiden Tochterzellen letztlich das Cytoskelett regeneriert.

Die Aktinpolymerisation, bzw. -depolymerisation wird durch eine Reihe aktinbindender Proteine, u.a. Profilin, kontrolliert (Stossel et al., 1985). Die hohe Konserviertheit des Aktinmoleküls, die ähnlichen Funktionen, die Aktin in Hefe- und anderen eukaryontischen Zellen ausübt, sowie der ständige Auf- und Abbau des Aktingerüsts in der Hefezelle läßt in *Saccharomyces* einen

entsprechenden Apparat aktinbindender Proteine wie in höheren Eukaryonten erwarten.

Das hier charakterisierte Hefegen PFY besitzt einen offenen Leserahmen (126 Aminosäuren), der für ein Protein codiert, das eine hohe Homologie zu den drei Profilin-Isoproteinen von *Acanthamoeba* (125 Aminosäuren; Ampe et al., 1985, 1988a) und - deutlich weniger ausgeprägt - von Kalb und Mensch (je 139 Aminosäuren; Ampe et al., 1988b) aufweist. Kürzlich konnte aus *Saccharomyces* das Profilinprotein gereinigt werden. Die Aminosäuresequenz eines tryptischen Peptids des isolierten Proteins entspricht der aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten (diese Arbeit) von Pos. 4 bis 22 (Lillie & Brown, Ann Arbor, Michigan, USA; pers. Mitteilung). Es ist daher klar, daß PFY - zunächst nur aufgrund von Homologien bestimmt - für Profilin codiert.

Das Gen liegt in *Sacharomyces* als singuläre Genkopie pro haploidem Genom vor, während im motilen Einzeller *Acanthamoeba* drei Isoformen charakterisiert worden sind (Ampe et al., 1988a). In *Acanthamoeba* ist das Cytoskelett besonders ausgeprägt: Aktin und 20 weitere aktinbindende Proteine (u.a. die Profilin-Isoformen) entsprechen mehr als 25% des Gesamtproteins der Zelle (Pollard, 1988). Neben Northern Blot-Analysen (Magdolen et al., 1988) zeigt die Charakterisierung des cDNA-Klons, der die dem PFY-Gen entsprechende Sequenz mit Ausnahme des Introns enthält, daß das Gen *in vivo* transkribiert wird. Die *in vitro*-Transkription und Translation des cDNA-Klons ergibt ein Protein, das etwa das, aus der DNA-Sequenz abgeleitete, Molekulargewicht von 13340 besitzt (Magdolen et al., 1988). Die rezessiv letale Wirkung der Inaktivierung des PFY-Gens beweist zudem, daß das PFY-Genprodukt für die Zelle lebensnotwendig ist: Die vier Sporen einer diploiden *pfy*/PFY-Hefemutante zeigen eine eindeutige 2:2 (letal/vital) Aufspaltung.

Die 3D-Struktur des *Acanthamoeba*-Profilins, das zum Hefeprotein sehr homolog ist, wurde von Pollard und Mitarbeitern mit einer Auflösung von 2.4 Å bestimmt (Pollard, (1988): das Molekül ist aus zwei Domänen aufgebaut, einer N-

terminalen, zum größten Teil aus β -Faltblattstruktur bestehend, und einer α -helicalen C-terminalen Domäne. Diese beiden Domänen sind über eine Kluft miteinander verbunden. In diesem Bereich treten auch die augenfälligsten Unterschiede zwischen den drei Isoproteinen des Profilins bei diesem Organismus auf. Da aber die Isoformen hinsichtlich der Aktinbindeaktivität nicht unterscheidbar sind, sind die Aminosäureaustausche in diesem Bereich für die Funktion des Proteins nicht entscheidend. Der Vergleich zwischen Hefe- und *Acanthamoeba*-Profilin offenbart, daß exakt in dieser variablen Region auch die größten Interspeziesunterschiede auftreten (Abb. 25).

Die Profiline aus Vertebraten (z.B. von Kalb) zeigen lediglich am N-Terminus eine ausgeprägte Homologie zu den Profilinen aus *Acanthamoeba* (und *Saccharomyces*). Daher wurde diese Region (Aminosäure 1-35, s.a. Abb. 25) als aktinbindende Domäne vorgeschlagen (Ampe et al., 1985). Der C-terminale Bereich von *Acanthamoeba* und *Saccharomyces* enthält jedoch eine 16 Aminosäure-Sequenz, die eine hohe Ähnlichkeit zu den F-Aktin bindenden Proteinen cap42(a) aus *Physarum* (wahrscheinlich identisch mit Fragmin) und menschlichem Gelsolin besitzt (Ampe & Vandekerckhove, 1987). Eine mögliche Interaktion der C-terminalen Region mit Aktin lassen ebenfalls Quervernetzungsexperimente von (*Acanthamoeba*-)Aktin/Profilin vermuten: hierbei wurde das Lys-115 des Profilins (am C-Terminus lokalisiert) und der Glu-Rest 364 des Aktins als eine Kontaktstelle beider Proteine identifiziert (Pollard, 1988).

Das *Acanthamoeba*-Profilin bindet nicht nur an Aktinmonomere, sondern hat auch eine schwache Bindeaktivität für das sogenannte 'barbed end' eines wachsenden Aktinpolymers (Pollard & Cooper, 1984), das Säugerprotein besitzt eine solche Aktivität nicht (Kwiatkowski & Bruns, 1988). Daher ist es möglich, daß das *Acanthamoeba*- (und das Hefe-)Protein zwei verschiedene aktinbindende Domänen besitzt: die N-terminale Domäne (die ebenfalls im Säugerprotein konserviert vorliegt) interagiert mit G-Aktin und entfernt durch Bildung von 1:1 Komplexen diese Aktinmonomere aus dem zur Polymerisation verfügbaren G-

Aktinpool; die C-terminale Domäne (mit deutlichen Homologien zu anderen F-Aktin bindenden Proteinen), könnte mit wachsenden F-Aktinpolymere in Wechselwirkung treten (Ampe & Vandekerckhove, 1987).

Aktin wird in der Hefezelle konstitutiv exprimiert. Die Menge des zur Polymerisation verfügbaren G-Aktinpools könnte daher durch Variation der Profilinkonzentration in der Zelle reguliert werden. Die Promoter/lacZ-Fusionen, sowie die von U. Oechsner durchgeführten Transkriptionsuntersuchungen (Magdolen et al., 1988) deuten jedoch darauf hin, daß das PFY-Gen ebenfalls konstitutiv exprimiert wird. Die Regulation der Aktin/Profilininteraktion erfolgt möglicherweise durch Modulation der Ca^{2+} - oder ATP-Konzentration in der Zelle. Ca^{2+} und ATP beeinflussen die Aktinpolymerisation und die Profilaktinbildung (Korn, 1982). Vielleicht spielt aber auch Phosphatidyl-4,5-inositolbisphosphat ($PtdIns(4,5)P_2$) in der Kontrolle der Bildung der 1:1 Komplexe von Aktin und Profilin eine entscheidende Rolle. Es wurde nämlich gezeigt, daß $PtdIns(4,5)P_2$ - aber nicht die durch die Phospholipase C entstehenden Hydrolyseprodukte - an das (Säuger-)Profilin bindet und dabei die Interaktion des Proteins mit Aktin inhibiert (Lassing & Lindberg, 1985).

PFY enthält ein - in nukleären Genen von *Saccharomyces* sehr selten auftretendes - Intron. Da u.a. aber die meisten ribosomalen Proteingene und zwei (nukleäre) Gene für Cytochromoxidaseuntereinheiten intronhaltige Kerngene darstellen, wurde als mögliche Funktion der Introns die Kontrolle der Bildung stöchiometrischer Komplexe (z.B. Ribosomen) vorgeschlagen (Cumsy et al., 1987). Profilin bildet mit Aktin jedoch nur intermediäre Komplexe, die Menge an frei verfügbarem G-Aktin ist variabel (Korn, 1982). Daher ist solch eine regulatorische Funktion im Falle der PFY- und ACT1-Gene unwahrscheinlich.

Dem PFY-Gen voran (besonders auffällig von Pos. -320 bis Pos. -553) geht eine purinreiche Sequenz, die prinzipiell lediglich aus Wiederholungen des Triplets GAa besteht. Drescher et al. (1987) isolierten aus einer Mausgenbank mit Hilfe einer Promoterfalle ein Insertfragment, das ebenfalls größtenteils

aus den Triplets GAA bzw. GAG aufgebaut ist (das 309 bp-Fragment hat einen Puringehalt von 84.5%). Dieses Fragment wirkt als Promoter, stimuliert aber auch den heterologen β -Globinpromoter, wenn dieses Element in 3 kb-Entfernung vom Gen lokalisiert ist. Interessanterweise ergibt die genomische Analyse, daß das isolierte Fragment ein Mitglied einer mittelrepetitiver Sequenzfamilie in Maus darstellt. Polypurin-, bzw. Polypyrimidin-Regionen können wahrscheinlich eine andere als die normale B-Konfiguration der DNA ausbilden. Eine solche Struktur zeichnet sich durch Hypersensitivität gegenüber der S1-Nuklease aus (Cantor & Efstratiadis, 1984). Die Nicht-B Konfiguration vermittelt möglicherweise die Aktivierung der Transkription im Falle des (Maus-) Promoter/Enhancerelements (Drescher et al., 1987). Die purinreiche Region 5'-oberhalb des PFY-Gens ist dagegen anscheinend nicht S1-Nuklease sensitiv. Möglicherweise müssen im Falle des Hefeelements zusätzlich Proteine eine solche Struktur stabilisieren. H. Hermann (pers. Mitteilung) konnte eine spezifische Proteininteraktion mit der purinreichen Region nachweisen. In Hefe konnte kürzlich ebenfalls das Auftreten einer Familie mittelrepetitiver Sequenzen nachgewiesen werden (Wildeman et al., 1986). Erstaunlicherweise besitzen diese 40-50 mal im haploiden Genom vorkommenden Sequenzen einen verblüffend ähnlichen Aufbau wie der 'Mbo II-Cluster' oberhalb des PFY-Gens: die sogenannte 'CAT'-Familie ist prinzipiell aus Trinukleotiden aufgebaut (hier: (GAT)_n), es ergeben sich innerhalb einer 'CAT'-Region ebenfalls größere (bis zu 27 bp lange) Bereiche, die sich wiederholen. Hybridisierungsexperimente könnten zeigen, ob der 'Mbo II-Cluster' in Hefe ebenfalls als mittelrepetitive Sequenzfamilie auftritt. Wäre dies der Fall, wäre es interessant nachzuprüfen (z. B. durch Promoterverkürzungen des PFY/lacZ-Fusionsgens und Messung der resultierenden β -Galaktosidaseaktivität in Hefe), ob diese DNA-Elemente eine Aktivierung benachbarter Gene bewirken.

3. Analyse des rechten Arms von pUHC15-2

3.1. Herstellung der Subklone und Sequenzierung des rechten Arms von pUHC15-2. Identifizierung des GCY-Gens

U. Oechsner (1986) konnte zeigen, daß neben PFY (die mRNA dieses Gens hat eine Länge von ca. 650 b) mindestens ein weiteres Gen, dessen Transkript ca. 1300 b lang ist, auf dem genomischen Klon pUHC15-2 liegt. Durch die Einengung des transkribierten Bereiches des Klons (Oechsner, 1986; s.a. Abb. 20A) war klar, daß dieses Gen in unmittelbarer Nähe von PFY lokalisiert sein mußte. Daher wurde die Sequenzanalyse von pUHC15-2 auf den rechten Arm des Inserts ausgeweitet (Abb. 29, 30 und 35). Tatsächlich konnte ein längerer offener Leserahmen (312 Aminosäuren) in einem Abstand von nur 245 bp vom Stopcodon des PFY-Gens auf dem gegenüberliegenden DNA-Strang identifiziert werden (Abb. 30). Northern Blot-Analysen - durchgeführt mit Fragmenten, die ausschließlich Sequenzen des Leserahmens enthielten - zeigten, daß das ca. 1300 b Transkript tatsächlich aus dieser DNA-Region stammt (Oechsner et al., 1988). Wie die Analyse des Gens ergab (s.u.), wird dessen Transkription bei Wachstum auf Galaktose aktiviert. Die aus der DNA-Sequenz abgeleitete Proteinsequenz weist u.a. eine hohe Homologie zu einem majoren Augenlinsenprotein aus Frosch (p-Crystallin) auf. Daher wurde dieses Gen GCY (für galactose-inducible gene for a crystallin-like yeast protein) genannt.

3.2. Analyse der 5' und 3' flankierenden Region des GCY-Gens

Mit Hilfe eines 58 bp Hinf I/Rsa I Fragments (Pos. +21 bis Pos. +78 der codierenden Sequenz, Abb. 30) wurden die 5'-Enden der GCY-Transkripte bestimmt. Das endmarkierte Fragment (lediglich der zu der mRNA komplementäre Strang war radioaktiv markiert) wurde mit Gesamt-RNA aus glukose- und galaktosegewachse-

-427 GTCACCAAACTTCTATGGAGTGTATAAGAAATGTAAGTTATAACACCGCGGAACAATCGGGCAGACTAT

-356 TCCGGGAAGAACAGGAAGGGCGGTCTTTCTCCCTCATTGTCATAGCAAGGTCATTTCGCCTTCTCAGAAAGGGGTAG

-276 AATCAATCTAGCACGCAGATTGCAAAACCGGCTTAATAATATGCCTATCAGGCATTACCCGCTGTGACGAATCGCACCC

-196 GCTGCTCTCCTTAATTCCTAGAGTAGAAACCGAGCTTTCAGGAAAGACTACGGCAGTAAAGAATTGCTTTACTGGGGC

-116 TATAAAACCGGGAGAATCAAGACATCTTAATGACTTGATTGAGATGAGAGCTTAATGATGTCATCTTAGCAAGCTAAAA

-36 TTTGGACAGCTCTCATTACTAAATTAAGATAGAAAA M P A T L H D S T K I
ATG CCT GCT ACT TTA CAT GAT TCT ACG AAA ATC

34 L S L N T G A Q I P Q I G L G T W Q S K
CTT TCT CTA AAT ACT GGA GCC CAA ATC CCT CAA ATA GGT TTA GGT ACG TGG CAG TCG AAA

94 E N D A Y K A V L T A L K D G V R H I D
GAG AAC GAT GCT TAT AAG GCT GTT TTA ACC GCT TTG AAA GAT GGC TAC CGA CAC ATT GAT

154 T A A A T T Y R N E D Q V G Q A I K D S G V
ACT GCT GCT ATT TAC GGT AAT GAA GAC CAA GTC GGT CAA GGC AAT GAT TCA GGT GTT

214 F R E E I F V T T K L W C T Q H H E P E
CCT CGG GAA GAA ATC TTT GTT ACT ACA AAG TTA TGG TGT ACA CAA CAC CAG GAA CCT GAA

274 V A L D Q S L K R L G L D C L Y L W
GTA CGC CTG GAT CAA TCA CTA AAG AGG TTA GGA TTG GAC TAC GTA GAC TTA TAT TTG ATG

334 H W F E A R L D P A Y I K N E D I L S V P
CAT TGG GCT GCC ARA TTA GAT CCA GCC TAC ATC AAA AAT GAA GAC ATC TTG AGT GTG CCA

394 T F K D G S R A V D I T N W N F I K T W
ACA AAG AAG GAT GGT TCT CGT GCA GTG GAT ATC ACC AAT TGG AAT TTC ATC AAA ACC TGG

454 E L M Q E L P K T G K T G V S N F
GAA TTA ATG CAG GAA CTA CCA AAG ACT GGT AAA ACT AAG GCC GTT GGA GTC TCC AAC TTT

514 S I N N L K D L L A S Q G N K L T P A A
TCT ATA AAT AAC CTG AAA GAT CTA TTA GCA TCT CAA GGT AAT AAG CTT ACG CCA GCT GCT

574 N Q V E I M P L L P Q D E A L I N F C K S
AAC CAA GTC GAA ATA CAT CCA TTA CTA CCT CAA GAC GAA TTG ATT AAT TTT TGT AAA AGT

634 K G I V V E A Y S P L G S T D A P L L K
AAA GGC ATT GTG TTT GAA GCT TAT TCT CCG TTA GGT AGT ACC GAT GCT CCA CTA TTG AAG

694 E P V I L E I A K K N N V Q P G H V V I
GAA CCG GTT ATC CTT GAA ATT GCG AAG AAA AAT AAC GTT CAA CCC GGA CAG GTT GTT ATT

754 S W H V Q R G Y V V L P K S V N P D R I
AGC TGG CAC GTC CAA AGA GGT TAT GTT GTC TTG CCA AAA TCT GTG AAT CCC GAT CGA ATC

814 K T N R K I F T L S T E D F E A I N N I
AAA ACG AAC AGG AAA ATA TTT ACT TTG TCT ACT GAG GAC TTT GAA GCT ATC AAT AAC ATA

874 S K E K G E K R V V H P N W S P F E V F
TCG AAG GAA AAG GGC GAA AAA AGG GTT GTA CAT CCA AAT TGG TCT CCT TTC GAA GTA TTC

934 K *
AAG TAA TTGTTTTTGGTGTCTTCGTATGATTGTAATATGTAGATAAATTAACATAAGTATATCAAATGTGCGATAT

1012 TCTTAAGACTGTTTCGTAATATGTTAAATACCGGATGTGACTACATATAAAAGTCGCGCTTTTACAGTGATAATTAGC

1092 GTCAATCAATAAATATTGTAATAATAGGAACCGAAATCCCGCAGATGCCAGAATAGTGGTGTAATAGGCAAGAAAACT

1172 TTACCTGCATAAATTA

Abb. 30: DNA-Sequenz des GCY-Gens aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die Nukleotidsequenz des GCY-Gens ist von Pos. -427 bis einschließlich des Stoppcodons des benachbarten, vom gegenüberliegenden DNA-Strang transkribierten, PFY-Gens bei Pos. +1185 wiedergegeben. Die aus der DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz ist jeweils oberhalb dieser angegeben. Das UAS_a-ähnliche Element ist ober- und unterhalb der Sequenz durch Balken angedeutet, die TATA-ähnliche Sequenz und das Terminationssignal des PFY-Gens sind unterstrichen. Majore Initiationsstellen der Transkription sind durch ausgefüllte, minore durch offene Kreise angedeutet. Das, für die Primerelongation verwendete, 58 bp Hinf I/Rsa I-Fragment ist unterhalb der DNA-Sequenz durch eine Wellenlinie gekennzeichnet.

nen Zellen unter stringenten Temperaturen hybridisiert und der zu der GCY-mRNA komplementäre DNA-Primer mit Hilfe der reversen Transkriptase bis zum 5'-Ende der jeweiligen GCY-mRNA verlängert. Es wurden lediglich mit der mRNA aus galaktosegewachsenen Zellen spezifische Signale entdeckt, woraus sich ein erster Hinweis auf eine C-quellenabhängige Regulation der Transkription des GCY-Gens ableiten läßt (Abb. 31). Hierbei wurden zwei majore Initiationstellen der Transkription bei Pos. -44 und -45 identifiziert, zwei weitere minore Signale waren bei Pos. -53 und -59 zu beobachten (Abb. 30 und 31). Die Base an diesen Positionen stellt jeweils einen A-Rest, die in Hefe bevorzugte Base an den 5'-Enden der Transkripte (Scripati et al., 1976), dar. Bei Pos. -111 bis -116 befindet sich die Sequenz TATAAA, der kanonischen 'TATA-Box'-Sequenz in Hefe (Struhl, 1987) entsprechend. Die Initiationsstellen liegen 52-67 bp 3'-unterhalb des TATA-ähnlichen Elements. Das Hexanukleotid CAPyACA, das in der Nähe des Startcodons meherer stark exprimierter Hefegene (wie z.B. AKY, PFY und HTA1, diese Arbeit) zu beobachten ist, fehlt ebenso wie eine pyrimidinreiche Region im Promoterbereich des Gens, die ebenfalls in einer Vielzahl von Hefegenen (McNeil, 1988) auftritt. Die Region unmittelbar 5'-oberhalb des ATG-Startcodons ist A-reich, die Base an Pos. +6 ist ein T-Rest. Die Startcodonumgebung weist also einen hefetypischen Aufbau auf (Tab. 9).

Die intergenische Region zwischen PFY und GCY ist mit 245 bp (zwischen den jeweiligen Stopcodons dieser Gene) ausgesprochen kurz. Das 3'-Ende des PFY-spezifischen cDNA-Klons liegt lediglich 22 bp 3'-unterhalb des Stopcodons des GCY-Gens. Der 5'- nichttranslatierte Leaderbereich der GCY-mRNA ist zwischen 44 und 59 Basen lang (s.o.), die codierende Sequenz umfaßt 936 b. Bezieht man den, mit 20-60 b in Hefe relativ kurzen (Groner et al., 1974), Poly(A)-Schwanz mit ein, ergibt sich eine Transkriptlänge von maximal 1100 b ohne den 3'-nichttranslatierten Bereich des Transkripts. Die durch Northern Blot-Analysen bestimmte GCY-Transkriptlänge beträgt jedoch ca. 1300 b. Daher ist es sehr wahrscheinlich, daß der intergenische Bereich der beiden Hefegene PFY und GCY

1234 5 6

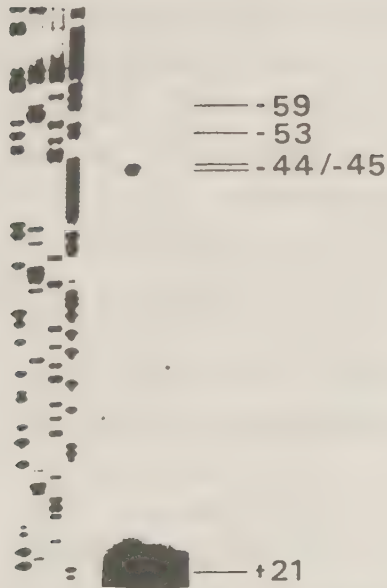


Abb. 31: Fragmentelongation zur Bestimmung der 5'-Enden der GCY-Transkripte

Spuren 1-4, Nukleotidleiter einer bekannten Sequenz. Spur 5, endmarkiertes 58 bp *Hinf*I/*Rsa* I-Fragment, hybridisiert gegen Gesamt-RNA aus Hefewildtyp (Galaktosemedium), elongiert mit Reverser Transkriptase. Spur 6, derselbe Versuchsansatz, aber mit Gesamt-RNA aus glukosegewachsenen Zellen durchgeführt. Die 5'-Enden der Transkripte sind angedeutet.

- zumindest zum Teil - überlappend transkribiert wird. Mehrere Versuche GCY-spezifische cDNA-Klone aus Hefegenbanken zu isolieren, um - analog zu der Bestimmung des 3'-Endes des PFY-spezifischen cDNA-Klons - den minimalen Bereich des 3'-nichttranslatierten Bereiches des GCY-Transkripts festzulegen, schlugen fehl (Oechsner, Trommler und Magdolen, unveröffentlichte Versuche), PFY-spezifische cDNA-Klone konnten dagegen in großer Anzahl isoliert werden (Oechsner, 1986). Ein Grund hierfür mag sein, daß die cDNA-Genbanken aus mRNA

glukosegewachsener Zellen hergestellt worden waren. Die durchgeführten Versuche der Primereelongation (Abb. 31), der GCY-Promoter/lacZ-Fusionen (s. 3.5.), sowie der Northern Blot-Analysen (U. Oechsner, pers. Mitteilung) zeigen jedoch, daß GCY-spezifische Transkripte bei Wachstum auf Glukose in äußerst geringen Konzentrationen gebildet werden, eine Isolierung eines cDNA-Klons aus diesen cDNA-Banken daher unwahrscheinlich ist.

Mehrere Sequenzelemente im 3'-nichtcodierenden Bereich (z.B. Pos. +954 - +964; +1026 - +1036; +1072 - +1081) zeigen Ähnlichkeiten mit dem Konsensus des Terminationssignals der Transkription in Hefe, TTTTATA(T)GT (Tab. 3; s.a. Magdolen et al., 1987), auf. Auf dem komplementären Strang liegt jedoch eine dem Konsensus perfekt entsprechende Sequenz (diese stellt auch das präsumptive Terminationssignal für die Transkription des PFY-Gens dar). Das Motiv liegt zentral zwischen den beiden Genen (115 bp, bzw. 121 bp 3'-unterhalb des Stopcodons des GCY-, bzw. PFY-Gens, Abb. 30). Zaret und Sherman (1982) konnten im Falle des CYC1-Gens zeigen, daß die Deletion einer 38 bp-Region im 3'-nichttranslatierten Bereich (die Deletion enthält das Motiv TTTTATAGT) nicht nur zu einer Verlängerung der CYC1-Transkripte, sondern ebenfalls der, vom komplementären Strang gelesenen, Transkripte des eng benachbarten Gens UTR1 (Barry et al., 1987) führt. Dieses Genpaar scheint also ein gemeinsames Terminationssignal zu besitzen. Möglicherweise wirkt das perfekte Konsensussequenzmotiv im intergenischen Bereich von GCY und PFY gleichfalls bidirektional. Der intergenische Bereich des PFY- und des GCY-Gens ist Gegenstand intensiver Untersuchungen zur Termination der Transkription in Hefe (W. Bandlow, pers. Mitteilung).

3.3. Die Aminosäuresequenz des GCY-Gens

Der offene Leserahmen (312 Aminosäuren) codiert für ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 35000. Das Fehlen längerer lipophiler Bereiche im

Protein (trotz des relativ hohen Gehalts an hydrophoben Aminosäuren (33%)) und typischer Präsequenzen sekretorischer, bzw. mitochondrialer Proteine deutet auf ein lösliches, cytoplasmatisches Protein hin. Die Codonauswahl weist eine deutliche Präferenz für die in Hefe bevorzugten Triplets auf: der CBI-Wert (Bennetzen & Hall, 1982) ist 0.25, vergleichbar z.B. mit den Genen, deren Genprodukte für den Galaktose-, bzw. Melibiose-Abbau in der Hefezelle verantwortlich sind (GAL1 = 0.20; GAL7 = 0.20; GAL10 = 0.14; MEL1 = 0.23). Der CBI-Wert dieser Gene ist zum einen deutlich höher als bei den schwach exprimierten, für Regulatorproteine codierenden Genen GAL4 (0.04), bzw. GAL80 (0.08), zum anderen aber niedriger als die moderat hoch exprimierten Gene PFY, bzw. AKY (0.67, bzw. 0.66).

Der Vergleich der aus der DNA-Sequenz abgeleiteten Primärstruktur des GCY-Genprodukts mit Proteinsequenzdatenbanken ergab eine signifikante Homologie zu bereits bekannten Proteinen. Zunächst wurde eine Verwandtschaft des GCY-Proteins zu einem majoren Augenlinsenprotein aus dem Frosch, ρ -Crystallin (Tomarev et al., 1984), festgestellt (37% identische Aminosäuren an vergleichbaren Positionen). Zu einem späteren Zeitpunkt (durch den nochmaligen Computervergleich mit neuen, vergrößerten Versionen der Datenbanken) ergab sich, daß das GCY-Protein zwischen 41% und 43% identische Aminosäuren (an vergleichbaren Positionen) mit Mitgliedern der Aldo/Keto-Reduktasefamilie aufweist (Tab. 10).

Die Mitglieder dieser Familie sind relativ kleine ($\approx$ 25-40 kD), (meist) monomere Enzyme, die NADPH als Coenzym benötigen und (zum überwiegenden Teil) im Cytoplasma lokalisiert sind. Diese Reduktasen zeichnen sich zudem durch geringe, größtenteils überlappende Substratspezifitäten aus (Wermuth, 1982; Flynn, 1982; Davidson, 1987). Die Aldo/Keto-Reduktasen werden in drei Gruppen unterteilt (Turner & Flynn, 1982; Wermuth, 1985). Aldehydreduktasen (ALR1) stellen die majore Reduktase in den meisten Geweben der Vertebraten dar und können von Aldosereduktasen (ALR2) z.B. aufgrund ihrer verschiedenen K_m -Werte

für das Substrat p-Nitrobenzaldehyd und der unterschiedlichen Hemmbarkeit durch Barbiturate unterschieden werden. Während ALR1 und ALR2 Aldehyde als bevorzugte Substrate benutzen, sind die Carbonylreduktasen (ALR3) präferentiell - aber nicht ausschließlich - Ketoreduktasen. Die Funktionen dieser drei Enzymklassen *in vivo* sind größtenteils noch nicht aufgeklärt. Die effektive Umwandlung der in der Zelle entstehenden, hoch reaktiven Aldehyde entweder zu Alkoholen durch Reduktasen oder zu Carbonsäuren durch Oxidasen ist aber möglicherweise für die Zelle lebensnotwendig (Vermuth, 1982).

	GCY	PGF	ALD	ADO	FRC
GCY		43%	41%	43%	37%
PGF	54.8		41%	49%	58%
ALD	45.9	68.8		50%	41%
ADO	46.0	68.6	59.1		50%
FRC	39.0	72.8	47.9	64.7	

Tab. 10: Homologievergleich des GCY-Proteins mit Mitgliedern der Aldo/Keto-Reduktasefamilie und mit p-Crystallin aus der Augenlinse des Frosches

In der oberen Halbtabelle sind % identische Aminosäuren (an vergleichbaren Positionen) angegeben. In der unteren sind die, durch das Computerprogramm ALIGN (Barker et al., 1983) bestimmten, SD-Werte für Sequenzhomologien (s. Tab. 5) angegeben. GCY, Proteinsequenz des GCY-Gens; PGF, Prostaglandin F-Synthase aus der Lunge des Rindes; ALD, Aldehydreduktase aus der menschlichen Leber; ADO, Aldosereduktase aus der Augenlinse der Ratte; FRC, p-Crystallin aus der Augenlinse von *Rana*

Die Primärstruktur je eines der Proteine der drei Gruppen ist inzwischen aus Saugern (durch die Analyse entsprechender cDNA-Klone) bekannt: neben der Sequenz der Aldehydreduktase aus der menschlichen Leber (Wermuth et al., 1987) und der - allerdings unvollständigen Sequenz der - Aldosereduktase aus der Augenlinse der Ratte (Carper et al., 1987), ist die Proteinsequenz der Prostaglandin F (PGF)-Synthase aus der Lunge vom Rind (gehört in die Gruppe der Carboxylreduktasen) (Watanabe et al., 1988) aufgeklärt.

Der Vergleich der Aldo/Keto-Reduktasen mit dem GCY-Protein (mit Hilfe des Computerprogrammes ALIGN, Barker et al., 1983) offenbart eine hohe, aber zu allen Reduktasen ähnliche, Homologie. Die SD-Werte (s. Tab. 5) bewegen sich zwischen 45 und 55 (in unabhängigen Versuchen können durchaus Variationen von +/- 4 SD-Einheiten auftreten) (Tab. 10). Die optimale Anordnung der Proteine (Abb. 32) zeigt ebenfalls, daß die Einordnung des GCY-Proteins in eine der drei Aldo/Keto-Reduktasegruppen aufgrund von Homologien nicht möglich ist. Neben den Reduktasen, wurde das GCY-Protein mit ρ -Crystallin, einem majoren Augenlinsenprotein des Frosches (Tomarev et al., 1984), verglichen. Dieses Protein dient in diesem Organ wahrscheinlich als strukturelles Element (und nicht als Enzym) und entspricht unter Umständen einer PGF-Synthase (Watanabe et al., 1988). Ca. 20% der Aminosäuren (67 von 346 vergleichbaren Positionen)

Abb. 32: 'Alignment' der Aminosäuresequenzen des GCY-Proteins mit Mitgliedern der Aldo/Keto-Reduktasefamilie und mit ρ -Crystallin aus der Augenlinse des Frosches
Die optimale Anordnung der Proteinsequenzen erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms ALIGN (Barker et al., 1983; s.a. Tab 5). Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben. Die Aminosäuren, die mit dem GCY-Protein identisch sind, sind nicht angegeben. Der Vergleich ausgewählter, besonders homologer Regionen ist in Oechsner et al. (1988) wiedergegeben. GCY, Proteinsequenz des GCY-Gens; PGF, Prostaglandin F-Synthase aus der Lunge des Rindes; ALD, Aldehydreduktase aus der menschlichen Leber; ADO, Aldosereduktase aus der Augenlinse der Ratte; FRC, ρ -Crystallin aus der Augenlinse von *Rana*

30

[illegible]

06

	121	90	120
GCY	NE	ED	QV
PGF	EE	QV	QV
ALD	PE	IE	QV
ADO	KE	QV	QV
REC	KE	QV	QV

150

	150	160
GCY	M H W P A R L D P A Y I K M E E D I L S V P T K K D G S R A V D	T V E L M Q E E L P K T G K T K A V G V S
PGF	I S V S K G - - - - - K K F V P - E S G K L C Y D S V D L C H E	A L R E C K D A L L V Q I L
ALD	Y A P E R G - - - - - D M F P P L A D G T I C Y D S T H Y K E E	K A L E A V K D A L L V Q I L
ADO	T G F K G - - - - - D Y F P P L A D G T I C Y D S T H Y K E E	T A A E A V D E L L V R S I
ARC	V S K S - - - - - G A S D D P S K D E K P F I Y D D V D L C A	A A E A R K K D A L L V R S I

210

[illegible]

270

[illegible]

330

[illegible]

sind in allen fünf Proteinen identisch. In der Mitte (Pos. 125 bis Pos. 159), sowie in der Nähe des C-Terminus der Proteine treten die geringsten Homologien untereinander auf. Morjana et al. (1987) stellten fest, daß im aktiven Zentrum sowohl der Aldehyd-, als auch Aldosereduktasen (isoliert aus Schwein und Mensch) das Tetrapeptid IPKS lokalisiert ist. Dieses Tetrapeptid findet man ebenfalls in der Aldosereduktase aus der Ratte (Abb. 32, Pos. 281 bis 284). Das Tetrapeptid liegt in einem gut konservierten Bereich, weist selbst jedoch geringe (homologe) Abweichungen in den anderen Proteinen auf: GCY-Protein, LPKS; PGF-Synthase und ρ -Crystallin, LAKS. Während PGF-Synthase und ρ -Crystallin keine Einführung von Lücken oder Insertionen zum optimalen Abgleich beider Proteine gegeneinander benötigen, müssen bei allen anderen Vergleichen solche eingeführt werden (Abb. 32). Neben diesen fünf Proteinen aus Eukaryonten ist eine weitere Aminosäuresequenz einer Reduktase aus einem prokaryontischen Organismus bekannt (nicht gezeigt): die 2,5-Diketo-D-Gluconsäure Reduktase aus *Corynebacterium* (Anderson et al., 1985) weist ebenfalls eine ähnliche Homologie zum Genprodukt von GCY auf (38% identische Aminosäuren, 46.9 SD-Einheiten). Der hohe Homologiegrad des GCY-Proteins zu Aldo/Keto-Reduktasen läßt vermuten, daß dieses Protein ebenfalls eine Aldo/Keto-Reduktase darstellt. Die andererseits deutlichen Unterschiede zu allen vergleichbaren Reduktasen machen eine Aussage über die vermutliche Funktion des Proteins in Hefe durch die Homologievergleiche nicht möglich.

3.4. Disruption des GCY-Gens

Die spezifische Inaktivierung des GCY-Gens in Hefe und die Untersuchung des eventuell auftretenden Phänotyps der Disruptionsmutanten war der erste Ansatz, um die mögliche Funktion des Genprodukts zu identifizieren. Zwei Disruptionen des GCY-Gens wurden durchgeführt: zum einen wurde der offene Leserahmen durch

Insertion eines 2.3 kb Hpa I-Fragments, das das gesamte LEU2-Gen trägt, in die Eco RV-Stelle unterbrochen (nicht gezeigt), andererseits wurde ein 850 bp Hind II/Eco RV-Fragment (Abb. 29A) durch das 2.3 kb (LEU2-)Fragment ersetzt. Zur Herstellung der Deletionsdisruptante wurde pBHG1700 (Abb. 29C) mit Hind II und Eco RV gespalten und das 850 bp-Fragment gegen das 2.3 kb Hpa I-Fragment (isoliert aus YEp13, Abb. 17) ausgetauscht (pgcy::LEU2). Dadurch wurden der gesamte Promoterbereich und der N-Terminus des Gens (von Pos. -427 bis +423, s. Abb. 30) entfernt. Aus pgcy::LEU2 wurde durch Spaltung mit Bam HI und Hind III ein ca. 3,2 kb-Fragment, das das disruptierte GCY-Gen enthält, isoliert und (als lineares Fragment) in den haploiden Hefestamm DL1 (leu2) transformiert. LEU-Transformanten wurden zunächst auf stabile Integration des LEU2-Markers getestet (s. *Material und Methoden*) und danach auf den korrekten Austausch des Wildtypgens gegen das disruptierte GCY-Gen durch genomische Southern Blot-Analyse überprüft. DNA aus dem Empfängerstamm DL1, sowie aus den Transformanten wurden mit Bam HI und Hind III gespalten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf NC-Papier übertragen. Die Hybridisierung erfolgte mit dem ursprünglichen Bam HI/Hind III-Fragment aus pBHG1700. Die Länge der entsprechenden genomischen Fragmente der Disruptanten (gcyDDO) nehmen, wie erwartet, von 1.8 kb auf 3.2 kb zu. Die Kontrollhybridisierung mit einem Fragment, das Sequenzen des LEU2-Gens enthält, ergibt neben dem Signal des inaktiven leu2-Gens von DL1 (bei ca. 5 kb) ein Signal bei der gleichen Größe wie das des disruptierten Genfragments (Abb. 33). Die Verschiebung des Signals von der Wildtyp-Position auf die erwartete Höhe beweist zudem, daß das GCY-Gen (durch eine andere Methode ebenfalls nachgewiesen (Oechsner et al., 1988)) lediglich in einer Kopie pro haploidem Genom auftritt. In den GCY-Disruptanten der Hefe sind keine GCY-spezifischen Transkripte nachweisbar (U. Oechsner, pers. Mitteilung). GCY wurde also im haploiden Genom des Empfängerstammes DL1 durch das konstruierte gcy-Fragment ersetzt, die Zellen sind trotz der Inaktivierung des GCY-Gens lebensfähig (die Disruptante, die durch die

Insertion des LEU2-Gens in den GCY-Leserahmen hergestellt worden war, verhielt sich identisch).

Mehrere unabhängig isolierte Disruptanten des gcyDDO-Typs wurden hinsichtlich des Phänotyps (im Vergleich zum Stamm DL1) näher untersucht. Bei Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen (wie z.B. Glukose, Galaktose, Glycerin oder Laktat) konnte ebensowenig ein Unterschied zu DL1 festgestellt werden, wie bei Wachstum bei unterschiedlichen Temperaturen (25°C, 30°C und 36°C). Auch in Minimalmedium oder in 'Shift'-Experimenten von einer C-Quelle auf eine andere (z.B. von Glukose- auf Galaktosemedium) verhielt sich die Disruptante gcyDDO wie der Stamm DL1 (nicht gezeigt). Das Verhältnis von DL1- (GCY leu2) und gcyDDO-Zellen (gcy LEU2) blieb bei Co-Kultivierung (und mehrmaligem 'Shift' von Glukose- auf Galaktosemedium, bzw. umgekehrt) über einen Zeitraum von über 2 Wochen absolut konstant (nicht gezeigt).

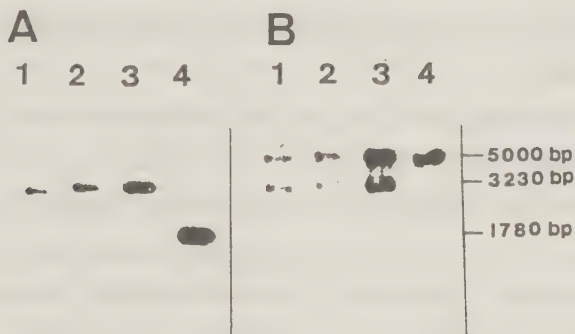


Abb. 33: Nachweis der Disruption des GCY-Gens

A) Genomische DNA verschiedener LEU-Transformanten und DL1 wurden mit Hind III + Bam HI gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt, auf NC-Papier transferiert und mit dem 1.8 kb Bam HI/Hind III-Fragment von pBHG1700 hybridisiert. Spuren 1-3, genomische DNA von drei haploiden Disruptanten; Spur 4, genomische DNA des Wildtyps DL1; B) gleicher NC-Filter, mit einem nicktranslatierten LEU2-spezifischen Hpa I-Fragment hybridisiert.

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, daß das GCY-Genprodukt (unter den getesteten Bedingungen) für das Leben der Hefezelle nicht essentiell ist, entweder weil die Enzymfunktion entbehrlich ist oder weil (mindestens) ein weiteres Enzym mit überlappender Substratspezifität in der Zelle vorhanden ist. Da auch die Inaktivierung des GCY-Gens keinerlei Hinweise auf die mögliche Funktion des Proteins lieferte, wird zur Zeit versucht, etwaige enzymatische Aktivitäten (von Aldo/Keto-Reduktasen) in *Saccharomyces* zu analysieren. Wenn solche Aktivitäten meßbar sind, sollte der Vergleich vom Wildtyp, der Disruptante gcyDDO und einer Hefetransformante, die das GCY-Gen plasmidcodiert in vielfacher Kopienzahl enthält, Aufschlüsse darüber erlauben, ob das GCY-Gen für eine Aldo/Keto-Reduktasefunktion (und gegebenenfalls für welche) codiert. Die Transformation von pUHC15-2 in Hefe - das Plasmid enthält sowohl das gesamte PFY-, als auch GCY-Gen - offenbart (in multipler Kopienzahl vorhanden) keinen Phänotyp.

3.5. Konstruktion eines GCY/lacZ-Fusionsgens und Untersuchung der Expression in Hefe

Die Versuche zur Bestimmung der 5'-Enden der GCY-Transkripte (und die Northern Blot-Analysen) gaben die ersten Hinweise darauf, daß die Transkriptkonzentration in Abhängigkeit der zur Verfügung stehenden C-Quelle in den Hefezellen variiert. Um diese Regulationsmechanismen näher untersuchen zu können, wurde der GCY-Promoter aus dem Klon pBHG1700 (Abb. 29C) als 1195 bp Rsa I-Fragment exzisiert und an die codierende Sequenz des bakteriellen lacZ-Gens (des mit Sma I linearisierten Vektors pMC1871 (Abb. 6)) fusioniert. Das Rsa I-Fragment enthält 26 N-terminale Tripletts der codierenden Sequenz des GCY-Gens (Abb. 35). Das lacZ-Gen des Vektors pMC1871 wird durch Sma I ebenfalls zwischen zwei Tripletts linearisiert. Durch die Insertion des GCY-Promoterfragments in die lacZ-Sequenz sollte daher (in einer der beiden

möglichen Orientierungen) die 'in frame'-Fusion des GCY N-Terminus an das lacZ-Gen gewährleistet sein (pMC/GCY). Neben den N-terminalen Sequenzen wäre der Promoterbereich bis Pos. -1117 (mit dem Startcodon ATG des GCY-Gens als Pos. +1) im Fusionsgen enthalten.

Da viele Hefepromotoren (z.B. der AKY-Promoter, diese Arbeit) auch in *E. coli* eine Transkription der benachbarten Sequenzen dirigieren (Struhl, 1986; Strobel et al., 1988), wurden nach der Transformation des konstruierten Plasmids die Empfängerzellen auf LB-Platten ausplattiert, die neben Tetrazyklin (für die Selektion auf Gehalt des Plasmids) auch XGal enthielten. Tatsächlich konnten auf diesen Platten blau gefärbte Kolonien beobachtet werden: In diesen Zellen wird also eine funktionelle β -Galaktosidase exprimiert. Die Analyse der Plasmide dieser Kolonien durch Restriktionen mit verschiedenen Enzymen offenbarte, daß die Plasmide das GCY-Promoterfragment in der gewünschten Orientierung enthielten (pMC/GCY). Neben den früh sichtbaren, stark blauen *E. coli*-Kolonien, konnten nach mehreren Tagen (bei 4°C) einige hellblaue Kolonien identifiziert werden. Diese enthielten alle das Rsa I-Fragment in der anderen Orientierung inseriert (nicht gezeigt), wobei hier die ersten 83 Aminosäuren des rechten offenen Leserahmens (s.u.) 'in frame' mit der codierenden Sequenz des lacZ-Gens fusioniert sind (pMC/ORFre). *E. coli*-Klone, die lediglich den Fusionsvektor pMC1871 (ohne Insert) enthielten, wiesen keine Blaufärbung auf (nicht gezeigt).

Die Messung der β -Galaktosidaseaktivitäten der *E. coli*-Klone, die das Plasmid pMC/GCY enthielten, zeigte, daß der GCY-Promoter in *E. coli* eine relativ starke Expression der β -Galaktosidase bewirkt: die beobachteten Aktivitäten entsprechen ca. 30% der mit IPTG maximal induzierten β -Galaktosidaseexpression des Stammes JM109 (durch α -Komplementation mit dem 'high copy number'-Plasmid pUC19). Die Expression der β -Galaktosidase ist, wie bei allen anderen (Hefe-)Promoter/lacZ-Fusionen, unabhängig von der Induktion durch IPTG (Tab. 11). Das Plasmid pMC/ORFre erlaubt, wie das PFY/lacZ-Fusionsgen (nicht

gezeigt), lediglich eine sehr niedrige (heterologe) Expression der β -Galaktosidase in *E. coli*.

Plasmid	IPTG	U/ml	relative Aktivität
pUC19	+	380.9	100.0%
	-	19.6	5.1%
pMC1871	+	0.4	0.1%
	-	0.4	0.1%
pMC/GCY	+	114.8	30.2%
	-	124.2	32.6%
pMC/ORFre	+	3.3	0.9%
	-	3.0	0.8%
pMC/AKY	+	23.3	6.1%
	-	32.9	8.6%

Tab. 11: β -Galaktosidaseexpression verschiedener Hefepromoter/lacZ-Fusionsgene im Vektor pMC1871 in *E. coli*
Die Messung der Aktivitäten erfolgte in An- oder Abwesenheit des Induktors des lac-Operons in *E. coli*, IPTG. Die angegebene β -Galaktosidaseaktivität (in U/ml; Miller, 1972) entspricht dem Durchschnitt aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Plasmide wurden in den Stamm JM109 (mit einem inaktiven lacZ-Genprodukt) transformiert. pMC1871 enthält das lacZ-Gen ohne den ersten 8 N-terminalen Aminosäuren; pMC/GCY, pMC/ORFre und pMC/AKY sind die, den jeweiligen Genen entsprechenden, Promoter/lacZ-Fusionen

Die Fusionsstelle zwischen den N-Termini von GCY, bzw. ORFre und dem lacZ-Leserahmen wurde durch Sequenzierung der entsprechenden Plasmide (pMC/GCY, bzw. pMC/ORFre) mit Hilfe des lacZ/DNA-Primers (Universal Primer [15 bp], Boehringer Mannheim) bestimmt. Hierbei entsprechen die Übergänge den erwarteten Sequenzen. Die jeweiligen ATG-Startcodons sowohl von GCY wie auch von ORFre liegen 'in frame' mit dem lacZ-Leserahmen (nicht gezeigt). Nachdem die korrekte Herstellung des GCY/lacZ- (bzw. ORFre/lacZ)-Fusionsgens

nachgewiesen war, wurden die Fusionsgene als je 4.3 kb große Sal I-Fragmente aus den entsprechenden pMC1871-Abkömmlingen isoliert und in die singuläre Xho I-Stelle des *E. coli*/Hefe-Shuttlevektors YEpl3 kloniert. Nach der Transformation der entsprechenden Konstrukte in den *E. coli*-Stamm JM109, wurden solche (Ampicillin-resistente) Kolonien gepickt, die in der Lage waren, XGal zu spalten. Es zeigte sich, daß die lacZ-Fusionsgene der GCY- und ORFre-Promotoren ähnliche heterologen Expressionsraten auf dem Vektor YEpl3 wie auf pMC1871 (Tab. 11) in *E. coli* bewirken (nicht gezeigt). Nach Überprüfung der isolierten Klone durch Restriktionsanalyse der entsprechenden Plasmide (YEpl/GCY, bzw. YEpl/ORFre), wurden diese in den haploiden Hefestamm AH215 leu2 transformiert (in beiden Transformanten [AH215 GCY/lacZ; AH215 ORFre/lacZ] konnte jeweils β -Galaktosidaseaktivität nachgewiesen werden). LEU-prototrophe Hefetransformanten wurden durch zweierlei Methoden auf den Besitz der YEpl3-Abkömmlinge getestet: bei Wachstum auf leucinhaltigem Medium segregierte die Fähigkeit, auf leucinfreiem Medium wachsen zu können gemeinsam mit der Befähigung zur Expression der β -Galaktosidase. Durch diesen sogenannten Co-loss/Co-retention-Test war also bewiesen, daß die Information für die Expression der β -Galaktosidase (und des intakten LEU2-Gens) plasmidcodiert in den Hefetransformanten vorlag. Für den zweiten Nachweis wurde das jeweilige Plasmid aus Hefe reisoliert, in *E. coli* rücktransformiert und durch Restriktionsanalyse überprüft. Die reisolierten Plasmide waren mit den in die Transformationen eingesetzten, YEpl/GCY und YEpl/ORFre, identisch.

Mehrere Hefetransformanten, die das GCY/lacZ-Fusionsgen enthielten, wurden hinsichtlich der Expression des Fusionsgens näher charakterisiert. Diese Untersuchungen deckten eine umfassende C-quellenabhängige Kontrolle der Expression durch den GCY-Promoter auf: bei Wachstum in Galaktose ist die gemessene β -Galaktosidaseaktivität um mehr als das 20fache höher als bei Wachstum in Glukose. Das Wachstum in Gegenwart anderer C-Quellen wie Glycerin, Laktat oder Raffinose offenbart Expressionsraten, die zwischen den in Glukose

und Galaktose beobachteten Werten liegen ($\approx$ 3-6fach höher als die Galaktosewerte). Sind sowohl Glukose als auch Galaktose im Medium vorhanden, entsprechen die gemessenen Werte denjenigen bei Wachstum in Glukose als alleiniger C-Quelle. Eine zusammenfassende Darstellung der gemessenen Werte mehrerer Versuche ist in Tabelle 12 wiedergegeben. Die Ergebnisse dieser Versuche machen wahrscheinlich, daß das GCY-Gen unter zweifacher Expressionskontrolle steht: es wird durch Glukose reprimiert, durch Galaktose dagegen aktiviert. Die Glukoserepression ist hierbei dominant über der Aktivierung des Gens durch Galaktose.

A > Plasmid	β -Galaktosidaseaktivität in Abhängigkeit von der C-Quelle					
	U	G	U+G	Y	L	R
GCY/lacZ	40.4	1084.7	48.4	144.5	117.2	229.7
ORFre/lacZ	98.5	100.3	n.t.	78.0	n.t.	n.t.
B >	relative Aktivität					
	U	G	U+G	Y	L	R
GCY/lacZ	1	26.9	1.2	3.6	2.9	5.7
ORFre/lacZ	1	1.0	-	0.8		

Tab. 12: β -Galaktosidaseaktivitäten der GCY/lacZ- und ORFre/lacZ-Fusionsgene in dem Hefestamm AH 215

A) Messung der lacZ-Expression von GCY/lacZ und ORFre/lacZ in Abhängigkeit von der C-Quelle. B) Relative Aktivitäten der β -Galaktosidase in den Transformanten, die GCY/lacZ, bzw. ORFre/lacZ enthalten, bei Wachstum mit verschiedenen C-Quellen. U, Wachstum in einem Minimalmedium, das 3% Glukose enthielt; G, 2% Galaktose; G+U, 3% Glukose + 2% Galaktose; Y, 3% Glyzerin; L, 3% Laktat; R, 3% Raffinose. Die jeweils angegebene β -Galaktosidaseaktivität (U/ml; Miller, 1972) entspricht dem Durchschnitt aus 9 (bei GCY/lacZ in Glukose-, Galaktose- und Glyzerinmedium), bzw. 4 unabhängig durchgeführten Experimenten. n.t., nicht geprüft

Die intrazellulären Konzentrationen der GCY-mRNA - untersucht im Hefewildtyp - sind in einem vergleichbaren Maße abhängig von der C-Quelle, in der die Hefe gezüchtet wurde, wie die exprimierten β -Galaktosidaseaktivitäten der GCY/lacZ-Fusionsgene (U. Oechsner, pers. Mitteilung). Es ist daher wahrscheinlich, daß die beobachteten Regulationsmechanismen auf der Ebene der Transkription erfolgen. Auf eine Überprüfung einer eventuellen Hamkontrolle des GCY-Gens (durch Transformation des GCY/lacZ-Fusionsgens in die in der δ -ALA-Synthase defizienten Mutante TO2 und Messung der resultierenden β -Galaktosidaseaktivitäten in An-, bzw. Abwesenheit von DIX) wurde verzichtet, da die Northern Blot-Analysen inzwischen zweifelsfrei ergeben hatten, daß eine solche Kontrolle des GCY-Gens nicht vorliegt (U. Oechsner, pers. Mitteilung).

3.6. Konstruktion von Deletionsmutanten im Promoterbereich von GCY

Die Aktivierung von GCY bei Wachstum in Gegenwart von Galaktose als alleiniger C-Quelle führte zu der Annahme, daß dieses Gen - wie die anderen bekannten galaktoseinduzierbaren Gene in Hefe (Johnston, 1987) - ebenfalls durch eine (oder mehrere) cis-aktive UAS_G-Sequenz(en) im Zusammenspiel mit dem Aktivator (GAL4-Genprodukt) und Repressor (GAL80-Genprodukt) reguliert wird. Daher wurde der Promoterbereich von GCY (bis zur Insertgrenze (Abb. 35) bei Pos. -1222, mit dem A vom Startcodon des GCY-Gens als Pos. +1) nach Sequenzmotiven abgesucht, die den bisher identifizierten UAS_G-Elementen (und der daraus abgeleiteten Konsensussequenz) ähneln. Tatsächlich tritt eine Sequenz mit hoher Homologie zum Konsensus bei Pos. -369 bis -353 auf, ca. 320 bp 5'-oberhalb der Initiationsstellen der Transkription, auf. Der Vergleich dieser UAS_G-ähnlichen Sequenz mit den bekannten UAS_G-Elementen (Giniger et al., 1985; Bram et al., 1986) ist in Tabelle 13 wiedergegeben.

15 von 17 Basen entsprechen dem Konsensus (keine der 11 anderen UAS_G-Sequenzen entsprechen zu 100% dem Konsensus). Die jeweils drei äußeren Basen - in

UAS _o	Abstand zur Initiationsstelle	Sequenz	Anzahl der, dem Konsensus (17 bp) entsprechenden, Basen	Spiegelsymmetrie
GAL10	224 (385)	CGGATTAGAAGCCGCCG	11	3
GAL10	243 (365)	CGGGTGACAGCCCTCCG	15	5
GAL10	261 (348)	AGGAAGACTCTCCTCCG	15	5
GAL10	316 (284)	CGCGCCGCACTGCTCCG	15	3
GAL7	162	CTGTTGACCGTGATCCG	11	5
GAL7	169	CGGACAACCTGTTGACCG	14	7
GAL7	258	CGGAGCACTGTTGAGCG	14	4
GAL2	273	CGGCGGTCITTCGTCCG	14	4
GAL2	356	CGGGCGGATCACTCCG	12	5
MEL1	≈ 225	CGGCCATATGCTTTCG	12	3
GAL80	98	CGGCGCACTCTCGCCCG	15	5
GCY	≈ 320	CGGGGCAGACTATTCG	14	5
Konsensussequenz der Bindungsstelle: C G G A G G A C A/T G C C G 21 21 20 18 18 18 18 20				

Tab. 13: Zusammenstellung aller bekannten UAS_o-Elemente und Vergleich zum UAS_o-ähnlichen Element des GCY-Gens

Die Sequenzen und Position (relativ zu der Initiationstelle der Transkription) der UAS_o-Elemente der Gene GAL10 (bzw. vom divergent transkribierten Gen GAL1 (Abstand zur Initiationsstelle unterhalb der GAL10-Werte in Klammern)), GAL7, GAL2, MEL1 und GAL80 sind aufgeführt. MEL1 und GCY besitzen multiple Initiationsstellen, daher sind nur ungefähre Abstände zur Initiationsregion der Transkription angegeben. In der rechten äußeren Spalte (Spiegelsymmetrie) ist die Anzahl der komplementären Basen (x/8) einer möglichen 'hairpin'-Struktur des jeweiligen 17mers angegeben. Unterhalb der einzelnen Sequenzen ist die Konsensussequenz aus den 22 Symmetrieelementen der 11 annähernd spiegelsymmetrischen UAS-Sequenzen der GAL-Gene angegeben. GCY wurde in der Aufstellung der Konsensussequenz nicht berücksichtigt. Mindestens zwei Drittel der Basen stellen die Base(n) im Konsensus an entsprechenden Positionen der UAS-Elemente dar.

den UAS_G-Elementen deutlich am höchsten konserviert - sind mit den, an diesen Positionen geforderten, Basen identisch. Ähnlich den UAS_G-Elementen, offenbart das Motiv im Promoterbereich von GCY eine nicht ganz perfekte Spiegelsymmetrie des 17 bp-Motivs (fünf von den acht möglichen Positionen, um den zentralen A-Rest angeordnet, entsprechen komplementäre Basen). Daher scheint es möglich, daß dieses UAS_G-ähnliche Element an der Vermittlung der Aktivierung des GCY-Gens durch Galaktose beteiligt ist.

Um dieses, aufgrund von Sequenzhomologien identifizierte, UAS_G-ähnliche Element auf seine mögliche Funktion zu testen, wurde eine Reihe von Deletionsmutanten in der Nähe dieses Elements im Promoterbereich von GCY hergestellt. Hierzu wurde das Plasmid pBHG1700 (Abb. 29C) mit Hind II geöffnet (die Schnittstelle liegt 55 bp vom UAS_G-ähnlichen Element entfernt), von beiden Enden her mittels der Exonuklease Bal 31 (in einer Zeitkinetik) verkürzt, religiert und in *E. coli* transformiert. Die verkürzten Plasmide einiger Transformanten wurden durch Restriktionsanalyse charakterisiert. Von den Plasmiden, die eine Deletion von 80 bis 180 bp enthielten, wurden die Endpunkte der Lücke festgelegt. Für diese Analyse wurde der Umstand ausgenutzt, daß die (singuläre) Xho I-Stelle (im 'Wildtyp'-Plasmid pBHG1700) lediglich 220 bp von der Hind II-Stelle entfernt ist. Die durch *in vitro* Mutagenese verkürzten pBHG1700-Derivate wurden daher mit Xho I und Hind III gespalten, die zwischen 1020 und 1120 bp großen Insertfragmente (Richtungs-orientiert) in pUC12 (mit Sal I und Hind III geöffnet) ligiert und von der Xho I/Sal I-Fusionsstelle aus sequenziert.

Drei, der analysierten, Klone waren für die weiteren Untersuchungen des UAS_G-ähnlichen Elements besonders gut geeignet (Abb. 34): pDEL104 und pDEL102 sind bezüglich eines Endpunktes der Deletion absolut identisch (Pos. -518), die Verkürzung in Richtung des anderen Endes fällt zum einen auf Pos. -336, zum anderen auf Pos. -381. In pDEL104 (Δ181 bp) fehlt die UAS_G-ähnliche Sequenz (Pos. -369 bis -353) vollständig, in pDEL102 (Δ136 bp) ist diese dagegen vollständig vorhanden. pDEL44 besitzt eine Deletion von 85 bp, diese reicht ge-

```

-530
ACITTCTAAA GTCCGAGAAA TCCGCTTGAA TGTCTTACAT ATTGCAATGG ATATGCTTGG GTGATCATAC TTCCTGGCTT TAGATATTTG AAACCTTAAC
Δ181bp ACITTCTAAA GTC-----
Δ136bp ACITTCTAAA GTC-----
Δ 85bp ACITTCTAAA GTCCGAGAAA TCCGCTTGAA TGTCTTACAT ATTGCAATGG ATATGCTTGG GTGATCATAC TTCCTGGC-----

-430
CTTGTCAACA AACCTTCAT GGAGTGTATA AGAATTGTAA GTTATAACAC CGCGCAACAA TCGGGGCAGA CTATTCCGGG GAAGAACAAG GAAGGGCGG
Δ181bp CTTGTCAACA AACCTTCAT GGAGTGTATA AGAATTGTAA GTTATAACAC CGCGCAACAA TCGGGGCAGA CTATTCCGGG GAAGAACAAG GAAGGGCGG-----GGCGG
Δ136bp CTTGTCAACA AACCTTCAT GGAGTGTATA AGAATTGTAA GTTATAACAC CGCGCAACAA TCGGGGCAGA CTATTCCGGG GAAGAACAAG GAAGGGCGG-----C
Δ 85bp CTTGTCAACA AACCTTCAT GGAGTGTATA AGAATTGTAA GTTATAACAC CGCGCAACAA TCGGGGCAGA CTATTCCGGG GAAGAACAAG GAAGGGCGG-----CGGCAGA CTATTCCGGG

```

Abb. 34: Bestimmung der Endpunkte der Deletionen von pDEL104, pDEL102 und pDEL44

Die Nukleotidsequenz des Promoterbereichs von GCY ist von Pos. -530 bis -331 angegeben (Das UAS_g-Element ist eingerahmt). pDEL104 besitzt eine Deletion von 181 bp (Δ181 bp), pDEL102 von 136 bp (Δ136 bp) und pDEL44 von 85 bp (Δ85 bp). Die entsprechenden Plasmide pB104, pB102 und pB44 waren Ausgangspunkt für die Konstruktion der entsprechenden GCY/lacZ-Fusionsgene, GCYΔ181/lacZ, GCYΔ136/lacZ und GCYΔ85/lacZ

rade in das UAS_g-ähnliche Element hinein. Hierbei werden die in den UAS_g-Elementen hoch konservierten drei äußeren Basen eines Endes von CGG in GCG verändert (keines der bekannten UAS_g weicht an diesen Positionen um zwei Basen vom Konsensus ab (Tab. 13)).

Die, zu pDEL104, pDEL102 und pDEL44 korrespondierenden, pBHG1700-Derivate (pB104, pB102 und pB44) wurden mit Rsa I gespalten und die entstehenden 1020-1120 bp großen Fragmente, die die ersten 26 N-terminalen Triplets des GCY-Gens, sowie den veränderten Promoterbereich bis Pos. -1117 (nach 'Wildtyp'-Sequenz) enthalten, isoliert. Diese 'Promoterfragmente' wurden - wie in 3.5. für die Herstellung des GCY/lacZ-Fusionsgens ausführlich beschrieben - mit der

codierenden Sequenz des lacZ-Gens 'in frame' fusioniert und durch direkte Sequenzierung dieser Plasmide auf die korrekte Fusionsstelle hin kontrolliert. Die Fusionsgene wurden dann aus pMC1871 in den Hefevektor YEp13 umkloniert (YEpΔ181, YEpΔ136 und YEpΔ85) und in den Stamm AH215 leu2 transformiert. LEU-prototrophe Transformanten (deren Fähigkeit auf leucinfreiem Medium zu wachsen plasmidcodiert war) wurden schließlich hinsichtlich der Expression des lacZ-Gens (im Vergleich zum 'Wildtyp'-GCY/lacZ-Gen) bei Wachstum mit verschiedenen C-Quellen überprüft (Tab. 14).

Der Vergleich der Hefen, die das Plasmid YEpΔ181, bzw. YEpΔ136 enthalten, zeigt eindeutig, daß die, für die Galaktoseinduktion verantwortlichen, Sequenzen zwischen Pos. -336 und -381 liegen müssen: während der, lediglich um 136 bp verkürzte, GCY-Promoter Expressionsraten des lacZ-Gens bewirkt, die dem ursprünglichen GCY/lacZ-Fusionsgen entsprechen, sinkt die Expression des lacZ-Gens von YEpΔ181 in der Hefe bei Wachstum auf Galaktose oder Glycerin drastisch ab. Zudem weist das Plasmid YEpΔ85 ebenfalls eine drastische Reduktion der β -Galaktosidaseaktivitäten in Gegenwart von Galaktose als C-Quelle auf. Im Gegensatz zu der Expression des lacZ-Gens auf YEpΔ181 scheint bei YEpΔ85 jedoch der Effekt der Glukoserepression noch aufzutreten (Tab. 14). Diese Ergebnisse machen sehr wahrscheinlich, daß das aufgrund von Sequenzhomologien identifizierte UAS_G-ähnliche Element im Promoterbereich des GCY-Gens von funktioneller Relevanz ist. Die relativ hohe Basalexpression von GCY bei Wachstum der Zellen in Gegenwart von Glukose im Vergleich zu anderen galaktoseregulierten Genen (wie z.B. GAL1, GAL7 und GAL10) ist, - wie die ebenfalls recht hohe Basalexpression des GAL80-Gens (Shimada & Fukasawa, 1985) - unabhängig von dem UAS_G-Element (und daher vom GAL4-Protein), da die Deletion des Elements diese nicht beeinflusst. Vielmehr bewirkt die Deletion des Elements unabhängig von der verwendeten C-Quelle eine Verminderung der Expression auf diesen Basalspiegel. Während die Gene GAL1, GAL2, GAL7 und GAL10 bei Wachstum in Gegenwart von Glycerin oder Ethanol vollständig reprimiert

Plasmid	UAS _a	β-Galaktosidaseaktivität in Abhängigkeit von der C-Quelle				relative Aktivität			
		U	G	U+G	Y	U	G	U+G	Y
GCY/lacZ	+	57.8	1237.8	69.4	173.5	1	21.4	1.2	3.0
Δ136/lacZ	+	60.7	1127.3	64.1	208.6	1	18.6	1.1	3.4
Δ181/lacZ	-	40.4	39.5	37.7	49.1	1	1.0	0.9	1.2
Δ85/lacZ	+/-	32.7	69.0	39.3	81.5	1	2.1	1.2	2.7

Tab. 14: β-Galaktosidaseaktivitäten der GCY/lacZ-, bzw., die Promoter-deletionen enthaltenden, GCYΔ181/lacZ-, GCYΔ136/lacZ und GCYΔ85/lacZ-Fusionsgene in dem Hefestamm AH 215. Die Messung der lacZ-Expression der verschiedenen Plasmide erfolgte nach Wachstum der entsprechenden Hefetransformanten mit verschiedenen C-Quellen. U, Wachstum in einem Minimalmedium, das 3% Glukose enthält; G, 2% Galaktose; G+U, 3% Glukose + 2% Galaktose; Y, 3% Glycerin. Die angegebene β-Galaktosidaseaktivität (U/ml; Miller, 1972) entspricht dem Durchschnitt aus 6 unabhängig durchgeführten Experimenten.

miert sind (also Expressionsraten aufweisen, die denjenigen bei Wachstum in Glukose entsprechen) (St. John & Davis, 1981; Tschopp et al., 1986), wird GCY in nicht vergärbaren Medien deutlich höher als in Gegenwart von Glukose exprimiert. Vergleichbare Verhältnisse sind bei den Genen MEL1 und GAL80 zu beobachten (Post-Beittenmiller et al., 1984; Shimada & Fukasawa, 1985). Diese beiden Gene enthalten jedoch, wie GCY, lediglich ein UAS_a-Element, während die anderen durch Galaktose induzierbaren Gene mindestens zwei UAS_a-Sequenzen im

Promoterbereich aufweisen. GAL/HIS-Fusionsgene, die im Promoterbereich ein, zu dem Konsensus synthetisch hergestelltes, UAS_G-Oligonukleotid enthalten, verhalten sich wie GAL80, bzw. MEL1. Bei Einführung eines zweiten UAS_G-Oligonukleotids ist die Expression dieses Fusionsgens in Glycerin (wie in Glukose) jedoch vollständig reprimiert (Bram et al., 1986). Die durch Galaktose voll induzierte, maximale Expression des MEL1-Gens (mit einer UAS_G) entspricht der der GAL1, GAL7 und GAL10-Gene (mit multiplen Bindungsstellen für den Induktor GAL4) (Post-Beittenmiller et al., 1984). Die relativ geringe Induktion des GCY-Gens (zwischen 20-30fach) durch Galaktose beruht daher möglicherweise mehr auf der ziemlich hohen Basalexpression als auf einem nicht effektiven UAS_G-Element.

Die Orientierung der Insertion der Promoter/lacZ-Fusionsgene in die Xho I-Stelle des Vektors YEp13 spielt für die jeweilige Expression keine Rolle. Da die Xho I-Stelle innerhalb des 5'-terminalen Bereichs des (Hefe-)LEU2-Gens lokalisiert ist, hätte die Möglichkeit bestanden, daß durch die jeweilige Orientierung der Insertion des Fusionsgens artifiziell unterschiedliche Expressionsmuster zustande kommen. Die Expression der Fusionsgene, sowohl von YEp/GCY, YEpΔ102 als auch YEpΔ104, wurden in beiden Orientierungen in Hefe getestet. Es konnten zwar geringe Abweichungen in den Absolutwerten der β-Galaktosidaseaktivitäten gemessen werden, die Tendenz der C-quellenabhängigen Expression war jedoch in allen Fällen vergleichbar und unabhängig von der Orientierung im Vektor YEp13 (nicht gezeigt).

Die Expressionsmuster von GAL1/lacZ- bzw. GAL10/lacZ-Fusionsgenen, entweder auf 'multi copy'-Plasmiden oder integriert ins Genom der Hefe, unterscheiden sich nicht qualitativ. Auf einem 2μ-haltigen Plasmid (das ungefähr in 7-14facher Kopienzahl pro haploidem Genom vorkommt) ist allerdings (in Galaktosemedium) lediglich ungefähr eine doppelt so große Expressionsrate zu beobachten wie von einer singulären Kopie. Das GAL4-Genprodukt ist lediglich in wenigen Kopien pro Wildtypzelle vorhanden. Es ist daher wahrscheinlich der

limitierende Faktor für die Transkription und wird durch ein 'multi copy'-Plasmid, das UAS_a-Elemente enthält, austitriert (Yocum et al., 1984). Der für die Untersuchung der GCY/lacZ-Expression verwendete Vektor YEpl3 stellt ebenfalls einen 'multi copy'-Vektor dar. Die maximale Expressionsrate wird daher wahrscheinlich unterschätzt. Aufgrund der möglicherweise variablen Kopienzahl ist es nicht möglich die Expressionsraten verschiedener Konstrukte miteinander zu vergleichen. Der Vergleich der Expression ein und desselben Plasmids unter verschiedenen Bedingungen ergibt jedoch reproduzierbare - und mit singulären Genkopien vergleichbare - Resultate (Yocum et al., 1984).

3.7. Untersuchung des 5'-oberhalb des UAS_a-Elements liegenden Bereichs von pUHC15-2

Die durch Computeranalyse gefundene UAS_a-Sequenz ca. 400 bp 5' oberhalb des GCY-Gens erforderte die Ausdehnung der Sequenzanalyse über die Hind II-Stelle bei Pos. -427 (in Bezug auf das ATG-Startcodon des GCY-Gens), um das etwaige Auftreten weiterer Elemente zu überprüfen. Die Bestimmung der Sequenz wurde daher bis zur (rechten) Insertgrenze von pUHC15-2 fortgeführt. Wie bereits erwähnt (s. 3.6.), konnten keine weiteren zu den UAS_a-Elementen homologen Motive gefunden werden. In einem Abstand von ca. 870 bp 5'-oberhalb des Startcodons von GCY wurde jedoch ein weiterer offener Leserahmen (ORF_{re}), auf dem anderen DNA-Strang als GCY codiert, identifiziert (Abb. 29 und 35). Dieser offene Leserahmen geht über die Bam HI-Stelle der Insertgrenze von pUHC15-2 hinaus.

Die, auf pUHC15-2 codierten, 117 Aminosäuren ergeben für das präsumptive Proteinprodukt ein minimales Molekulargewicht von 12800. Die Tripletts weisen keine Präferenz für in Hefe bevorzugte Codons auf. Dies kann zum einen bedeuten, daß der offene Leserahmen zufällig generiert ist und kein Gen darstellt, zum anderen kann die statistische Benutzung der Codons auf ein

wenig exprimiertes Gen hinweisen (Bennetzen & Hall, 1982). Ein ORFre entsprechendes Transkript konnte in Northern Blot-Experimenten zwar noch nicht nachgewiesen werden (U. Oechsner, pers. Mitteilung), die Struktur der stromauf des ORFre liegenden Region weist aber typische Merkmale eines Hefepromoters auf. So befinden sich z.B. bei Pos. -50 bis -55, -63 bis -68 und -96 bis -101 (mit dem Startcodon ATG von ORFre als Pos. +1) drei TATA-ähnliche Sequenzen (Abb. 35), die Startcodonumgebung ähnelt ebenfalls der bevorzugten Hefesequenz (Tab. 9). Um näher zu untersuchen, ob die Region oberhalb von ORFre ein promoterähnliches Element darstellt, wurde von diesem Bereich (mit dem N-Terminus von ORFre) eine 'Promoter'/lacZ-Fusion durchgeführt. Die Messung der Enzymaktivität der β -Galaktosidase (vor allem auf einem 'multi copy'-Vektor wie YEpl3 exprimiert) sollte einen sensitiveren Test als Northern Blot-Analysen darstellen, um eine sehr geringe Expression feststellen zu können. Für die Fusion des Fragments an die codierende Sequenz wurde die Rsa I-Spaltstelle zwischen den Tripletts für Aminosäure 83 und 84 benutzt (Abb. 35), wie in 3.5. ausführlich beschrieben.

Tatsächlich konnten in Hefe - nach Transformation mit YEpl/ORFre - relativ hohe β -Galaktosidaseaktivitäten gemessen werden. Die Expression des ORFre/lacZ-Gens ist jedoch, im Gegensatz zum GCY/lacZ-Gen, unabhängig von der C-Quelle. Die konstitutive Expression von ORFre (und die relativ hohe Basisexpression von GCY) sind möglicherweise auf zwei, jeweils 13 bp lange, Poly(dA-dT)-Blöcke bei Pos. -284 bis -296 und -318 bis -330 zurückzuführen (Abb. 35). Solche Blöcke, wirken als 'upstream promoter elements' mehrerer konstitutiv exprimierter Hefegene und bilden zusammen mit bestimmten TATA-Elementen konstitutive Hefepromotoren (Struhl, 1986, 1987). Diese TATA-Elemente weichen jeweils um eine Base von der vorgeschlagenen Konsensussequenz TATAAA ab. Tatsächlich weisen die drei TATA-ähnlichen Elemente im 'Promoterbereich' von ORFre (TAAAAA, TAAAAA und TATAGA), sowie ein Motiv 110 bis 124 bp oberhalb der Initiationsstellen der Transkription des GCY-Gens (TAGAAA) eine solche Struktur auf.

-949 CGT^R ACC TAA ACC TAT TTG AGG GAT TTG GGC TCC AGT ATT TAG AGA AAG GAT TTT CGT AGA
 ← GCY-GEN
 -889 ATC ATG TAA AGT AGC AGG CAT TTTTCTATCTTAATTTAGTAATGAGAGCTGCCAAATTTAGCTTGCTAAGA
 -816 TGCACCTATTAAGCTCTCATCCTGAATCAAGTCATTAGAATGTCTTGATTCTCCCGGTTTTATACGCCCCAGTAAAGCAAT
 -716 TCTTTACTCGCGTAGTCTTTTCTGAAAGCTCGGTTTCTACTCTAGGGAATTAAGGAGAGCAGCGGTGTGCGATTCTGTA
 -656 CACGGGTGAATGCCTGATAGGCATATTATTAAGCCGTGTTTGCAATCTCGGTGCTAGATTGATTCTACCCCTTTCTGAGA
 -576 AGGCGAAATGACCTTGCTATGACAATGAGGGAGAAAAAGCCGCCCTTCCTTGTTCTTCCCCGGAATAGTCTGCCCGATT
 -496 GTTCGCCGGTGTTATAACTTCAAACTCTTATACACTCCATAGGAAGTTTGTTGACAAGAGTTAAGTTTCAAATATCTAAA
 -416 GCCAGGAAGTATGATCACCCAAGCATATCCATTGCAATATGTAAGACATTCAAGCGGATTCTGGGACTTTAGAAAAGTGA
 -336 AATTAAAAAAAAAAAAAATTAAACAGAGTCTACTTCCAAAAAAAAAAAAAATGTAGAACTGGGCGAAATATCATCAGCT
 -256 CATTCACTCTAATGCGGCCCTTCTGTAACCTCGAGCAAAGAGCCAAATAACTTCATCTCTTCTCTTACGAACTGAAA
 -176 TATTCTCATGTTACCTATTGAGTAGTTGCGGGGACATTGGCGCGCAGAAAGAGTGAAAACTTTATAGTGAATTATAG
 -96 AAATTGAGATGAGATGAGATACTAAGACTAAAATAATAAGTAAAAGAAGTTAAACAGATTTAGAGATTCAAACCTCCG
 ORF re→
 -16 TTATTTT TAGAAGGTC ATG TCC TTG GAA GAT AAA TTT GAT TCA TTG TCT GTG TCG CAA GGT
 M S L E D K F D S L S V S Q G
 46 GCC TCG GAC CAT ATT AAT AAT CAG CTC TTA GAG AAG TAT AGT CAC AAA ATA AAA ACT GAT
 A S D H I N N Q L L E K Y S H K I K T D
 106 GAA TTA TCA TTC AGC AGA GCG AAA ACA TCA AAG GAT AAA GCA AAT AGG GCG ACT GTG GAA
 E L S F S R A K T S K D K A N R A T V E
 166 AAT GTC TTA GAT CCG AGA ACT ATC AGC TTT TTG AAG TCT ATG GTC ACC AGA GGT GTG ATT
 N V L D P R T I S F L K S M V T R G V I
 226 GCA GAT TTG AAC GGT TGC TTA AGT^HACT GGG AAA GAA GCT AAT GTT TAC CAC GCT TTT GCA
 A D L N G C L S T G K E A N V Y H A F A
 286 GGT ACC GGT AAG GCA CCC GTA ATA GAT GAG GAA ACA GGC CAG TAT GAA GTT TTA GAG ACA
 G T G K A P V I D E E T G Q Y E V L E T
 346 GAC GGA TCC
 D G S

Der Nachweis der Expression des ORFre/lacZ-Fusionsgens in Hefe läßt vermuten, daß der auf dem Klon pUHC15-2 nicht vollständig vorhandene Leserahmen ORFre tatsächlich ein Gen darstellt. Der Sequenzvergleich mit Proteindatenbanken offenbarte keine ausgeprägten Homologien zu bislang sequenzierten Proteinen. Die Natur des (prasumptiven) Genprodukts von ORFre konnte daher nicht eingegrenzt werden. Die weiteren Analysen von ORFre sollten zum einen die Isolierung eines Anschlußklons von pUHC15-2, die Ausdehnung der Sequenzanalyse von ORFre, sowie die Disruption des Leserahmens und Charakterisierung des etwaig auftretenden Phänotyps beinhalten.

3.8. Diskussion

In unmittelbarer Nähe des PFY-Gens konnte ein weiterer Leserahmen (GCY) identifiziert werden, dessen abgeleitete Proteinsequenz eine hohe Homologie zu Aldo/Ketoreduktasen aufweist. Die Bestimmung der 5'-Enden der GCY-mRNA (Abb. 31) zeigen, daß der Bereich von GCY *in vivo* transkribiert wird. Northern Blot-Analysen, durchgeführt mit Fragmenten, die ausschließlich codierende Sequenzen von GCY enthalten, markieren ein Transkript von etwa 1300 b Länge (Oechsner et al., 1988). Da zudem durch die Herstellung von GCY/lacZ-Fusionsgenen (und durch Northern Blot-Analysen) eine umfangreiche Kontrolle der Expression durch Galaktose (und Glukose) von GCY aufgedeckt wurde, stellt GCY mit größter Wahrscheinlichkeit tatsächlich ein Gen dar.

Die Expression der verschiedenen, in Hefe durch Galaktose regulierten Gene wird durch einen gemeinsamen Mechanismus kontrolliert. In der Promoterregion dieser Gene sind mit variablem Abstand DNA-Motive (UAS_a) lokalisiert, an die der Aktivator GAL4 bindet (Giniger et al., 1985). Dieses Protein interagiert mit einem oder mehreren Proteinen des Transkriptionsapparates (z.B. mit TATA-Box bindenden Proteinen), diese Protein-Protein

Wechselwirkung führt schließlich zur Aktivierung der Transkription (Brent & Ptashne, 1985). GAL4 bindet bei Wachstum der Zellen auf den meisten C-Quellen (wie z.B. Galaktose, Glycerin und Ethanol) an UAS_a (Lohr & Hopper, 1985; Giniger et al., 1985). In Abwesenheit des Induktors (der noch nicht identifiziert ist) bindet der Repressor GAL80 an GAL4 (Lue et al., 1987), maskiert dessen C-Terminus und verhindert so die Aktivierung der Transkription. Bei Wachstum in Galaktose tritt jedoch der jetzt synthetisierte Induktor mit GAL80 in Wechselwirkung. Der Induktor/GAL80-Komplex löst sich von GAL4 und die aktivierende Domäne des GAL4-Proteins wird frei. Lediglich unter reprimierenden Bedingungen (also bei Wachstum in Glukose) liegt GAL4 nicht an UAS_a gebunden in der Zelle vor. Hierbei bindet wahrscheinlich neben GAL80 ein weiteres Protein (CRP für catabolite repressing protein) an GAL4 und verhindert die Bindung von GAL4 an UAS_a (Johnston, 1987). Die Gene GAL1, 2, 7 und 10 sind bei Wachstum auf Glycerin u.s.w. (nicht Glukose oder Galaktose) inaktiv (St. John & Davis, 1981; Tschopp et al., 1986). Diese Gene besitzen zwei oder mehr GAL4 Bindungsstellen. Die Gene, die im Promoterbereich lediglich eine UAS_a besitzen, werden - im Vergleich zu der Expression in Glukose, bzw. Galaktose - intermediär exprimiert (Post-Beittenmiller et al., 1984; Shimada & Fukasawa, 1985). Mindestens zwei UAS_a-Elemente (mit daran gebundenen GAL4/GAL80-Komplexen) scheinen für die Repression der Expression unter diesen Bedingungen notwendig zu sein (Bram et al., 1986). In gal4-Stämmen sind die meisten Galaktose regulierten Gene inaktiv, d.h. die Transkription der Gene ist abhängig vom GAL4-Genprodukt. Eine Ausnahme ist hierbei GAL80, das unter diesen Bedingungen eine nachweisbare Basalexpression offenbart (Shimada & Fukasawa, 1985).

Die Expression des GCY-Gens erfolgt ähnlich dem vorgeschlagenen Kontrollmechanismus für galaktoseregulierte Gene: eine einzige UAS_a-Sequenz aktiviert die Transkription in Gegenwart von Galaktose. Bei Wachstum auf anderen C-Quellen (außer Glukose) wird GCY intermediär exprimiert (Tab. 12). Die Induktion der Expression von GCY bei einem 'Shift' von Nicht-

Galaktosemedium (z.B. Glycerin) in Galaktosemedium ist mit der der Gene GAL80 und MEL1 (Induktion zwischen 5 und 50fach) vergleichbar. GCY wird (dominant) durch Glukose reprimiert (Tab. 12), die ziemlich hohe Basalexpression führt zu relativ kleinen Unterschieden im Vergleich der Expression in Glukose-, bzw. Galaktosemedium (etwa 20fach im Vergleich zu mehr als 200fach bei GAL1 und GAL10). Diese Basalexpression ist wahrscheinlich nicht GAL4-abhängig, da die Deletion der singularen UAS_G-Sequenz die Expression von GCY nicht eliminiert (gemessen als Expression des GCY Δ 181/lacZ-Fusionsgens, s. Tab. 14). Die Konsensussequenz der UAS_G-Elemente zeigt einen annähernd spiegelsymmetrischen Aufbau und läßt vermuten, daß das GAL4-Protein (trotz seiner Größe von 99 kD) als Multimer, wahrscheinlich als Dimer oder Tetramer, an UAS_G (eine mit 17 bp-Länge ziemlich kurze Sequenz) bindet (Johnston, 1987). Die höchst konservierten Basen im Konsensus sind daher, wie erwartet, die äußeren Basen (CGG). Der zentrale G-Rest dieses Triplets wird z.B. vor der Methylierung durch Dimethylsulfat geschützt, wenn das GAL4-Produkt an das jeweilige UAS_G-Element gebunden vorliegt (Giniger et al., 1985). Tajima et al. (1986) konnten zudem zeigen, daß der Austausch dieses zentralen G-Restes gegen ein C-Rest in einem der UAS_G-Elemente des GAL7-Gens zu einer erheblichen Reduktion der Expression dieses Gens führt. Vergleichbare Verhältnisse liegen im Promoterbereich von GCY vor. Die Veränderung eines äußeren Endes des UAS_G-ähnlichen Elements (von CGG zu GCG) führt zu einer drastischen Reduktion der Induzierbarkeit durch Galaktose (gemessen als Expression des GCY Δ 85/lacZ-Gens, s. Tab. 14).

Trotz dieser umfassenden Regulation der Expression von GCY kann man nach Inaktivierung der im haploiden Hefegenom singulär vorliegenden Genkopie keinen beobachtbaren Phänotyp feststellen: das GCY-Genprodukt ist unter den getesteten metabolischen Bedingungen (z.B. auch bei Wachstum in Galaktosemedium) nicht essentiell. Zellen, defekt in einem der charakterisierten Gene, die für die Aufnahme und den Abbau von Galaktose verantwortlich sind (GAL1, 2, 5, 7, 10), offenbaren einen gal⁻-Phänotyp, können also Galaktose nicht für das

Wachstum verwerten. Den gleichen Phänotyp weisen gal4-Mutanten auf, in diesen Zellen werden die GAL-Gene bei Wachstum mit Galakose als C-Quelle aufgrund des Fehlens eines intakten GAL4-Produkts nicht aktiviert. gal80-Mutanten exprimieren die GAL-Gene konstitutiv. Neben diesen Genen (und MEL1, das für eine α -Galaktosidase codiert) sind durch genetische Analysen zwei weitere Gene bekannt, die mit dem Galaktosestoffwechsel verknüpft sind. Das GAL3-Protein scheint an der Synthese des Induktors der Galaktoseregulation beteiligt zu sein. gal3-Mutanten offenbaren eine extrem langsame Induktion der GAL-Genexpression nach Zugabe von Galaktose (3-5 Tage, im Wildtyp dagegen $\approx$ 20 min) (Torchia & Hopper, 1986). gcy-Mutanten verhalten sich in 'Shift'-Experimenten (von Glycerin, bzw. Glukose- in Galaktosemedium) wie Wildtypzellen, GCY entspricht daher nicht GAL3. Neben GAL3 sind noch mindestens zwei andere Funktionen an der Synthese des Induktors beteiligt. Für die Induktion der GAL-Expression ist entweder das Vorhandensein intakter Mitochondrien oder aber das Genprodukt des nukleären IMP-Gens notwendig. Der Phänotyp von imp-Mutanten wird nur dann sichtbar, wenn die Zellen nicht-funktionstüchtige Mitochondrien enthalten. imp-Stämme, die zudem rho⁻, mit⁻ oder pet⁻ sind, können also Galaktose nicht verwerten (Algeri et al., 1981). Die meisten Laborstämme, auch der Empfängerstamm DL1 der Disruption von GCY, sind imp⁻ (rho⁻). Die Frage, ob GCY möglicherweise mit IMP identisch ist, kann mit diesen Stämmen daher nicht beantwortet werden. Das GCY-Protein stellt mit hoher Wahrscheinlichkeit keinen neuartigen Regulator der GAL-Genexpression dar, da hierfür die relativ hohe Expressionsrate unter induzierenden Bedingungen, wie auch der CBI-Wert - vergleichbar mit den Werten von GAL1, 7, 10 und MEL1 -, dagegen spricht.

Die aus der DNA-Sequenz abgeleitete Primärstruktur des GCY-Proteins weist eine ausgeprägte Homologie zu der Enzymfamilie der Aldo/Keto-Reduktasen auf. Die Homologie des GCY-Proteins zu drei Vertretern der einzelnen Klassen aus Säugergeweben (ALR1-3) beträgt jeweils ungefähr 60% (identische + homologe

Aminosäuren an vergleichbaren Positionen). Die Funktionen der Aldo/Keto-Reduktasen, besonders die der Aldehyd (ALR1)- und Carbonyl (ALR3)-Reduktasen, sind zum größten Teil noch völlig unklar. Viele in der Zelle entstehende (biogenen) Aldehyde sind hoch reaktive Substanzen und können unter Umständen mit dem normalen Metabolismus interferieren. Die Inaktivierung dieser Aldehyde kann daher lebensnotwendig sein. Sie kann durch Reduktion zu den entsprechenden Alkoholprodukten (oder durch Oxidation zu Carbonsäuren) erreicht werden (Wermuth, 1982). Neben dieser allgemeinen Funktion werden für die verschiedenen Aldo/Keto-Reduktasen weitere spezifische physiologische Aufgaben diskutiert. Der Aldehydreduktase (ALR1) wird z.B. eine Rolle im Metabolismus von Inositol (Reddy et al., 1981) und die Reduktion von D-Glucuronat zu L-Gulonat (einer Vorstufe von L-Ascorbat in Tieren, die in der Lage sind Vitamin C zu produzieren) (Wermuth, 1982) zugesprochen. Carbonylreduktasen (ALR3) spielen vielleicht im Metabolismus von biologisch aktiven Chinonen, Prostaglandinen und Steroidhormonen eine wichtige Rolle (Wermuth, 1982). Zudem reduzieren diese Reduktasen eine Vielzahl fremder nicht-körpereigener (xenobiotischer) Substanzen, wie z.B. Ketoaldehyde, die das Zellwachstum inhibieren, und stellen daher möglicherweise einen Teil der Entgiftungsmaschinerie des Organismus dar (Moxon & Holmes, 1987). Aldosereduktase (ALR2) bildet zusammen mit der Sorbitoldehydrogenase den sogenannten Polyol-Stoffwechselweg, eine minore Route des Kohlenhydratmetabolismus für die Umwandlung von Glukose in Fruktose. Unter normalen Bedingungen wird dieser Weg (aufgrund der viel höheren Affinität der Hexokinase zu Glukose) praktisch nicht beschritten. Bei Diabetis sind die intrazellulären Glukosekonzentrationen jedoch extrem hoch. ALR2 wandelt nun verhältnismäßig viel Glukose in Sorbitol um, und es kommt zur Akkumulation von Sorbitol. Dadurch entsteht ein hyperosmotischer Effekt: Die Zellen schwellen an. Dieser Prozess initiiert z.B. die Kataraktbildung und andere diabetische Komplikationen. In Zellen mit erhöhten Galaktosekonzentrationen (Galaktosämie) ist ein noch schnellerer und größerer hyperosmotischer Effekt (mit ähnlichen

pathologischen Erscheinungsbildern) zu beobachten, da die reduzierte Form von Galaktose, Galaktitol, nicht reoxidiert wird und daher die intrazellulären Konzentrationen des polaren Zuckeralkohols (der nicht durch Membranen transportabel ist) sehr hoch bleiben (Kador, 1985). Die Bildung von Sorbitol in höheren Konzentrationen wird in gesunden Organismen in der Niere beobachtet (Bagnasco et al., 1986). Hierbei dient Sorbitol als nicht-toxischer intrazellulärer Osmolyt, um die hohen Natriumchloridkonzentrationen in der extrazellulären Flüssigkeit auszugleichen.

Aldo/Keto-Reduktasen aus Säugern sind hinsichtlich ihrer Primär- und Sekundärstruktur, ihrer Substratspezifitäten und Aktivitäten recht gut charakterisiert; aus anderen Organismen sind jedoch ebenfalls entsprechende Enzyme und ihre Eigenschaften teilweise bekannt, wie z.B. die 2,5 Diketo-D-Gluconsäure Reduktase aus *Corynebacterium* (Anderson et al., 1985), eine Carboxylyreduktase aus dem Schleimpilz *Mucor ambiguus* (Shimizu et al., 1988) und eine Aldosereduktase aus den Blättern vom Pfaffenhütchen (Negm, 1986). Spindelstrauchgewächse (*Celastraceae*, zu denen das Pfaffenhütchen (*Euonymus*) gehört) weisen einen sehr hohen Anteil von Galaktitol in ihren Blättern und im Leitbündelsaft auf (die Funktion dieses Stoffes in diesen Pflanzen ist unklar). In *Saccharomyces* ist noch keine Aldehyd- oder Zuckerreduktaseaktivität beschrieben. Die Expression von GCY wird durch Galaktose aktiviert, daher könnte das GCY-Genprodukt möglicherweise ebenfalls am Metabolismus von Galaktose, z.B. in der Reduktion von Galaktose zu Galaktitol, beteiligt sein. Das Auftreten solcher Zuckeralkohole als Zwischenprodukte oder Speicherstoffe im Stoffwechsel von Galaktose in Hefe ist jedoch nicht bekannt.

Neben der Homologie zu Aldo/Keto-Reduktasen weist das GCY-Protein eine ähnlich hohe Homologie zu ρ -Crystallin, einem majoren Augenlinsenprotein aus dem Frosch *Rana* auf. Der Vergleich der drei Vertreter der Aldo/Keto Reduktasen, des GCY-Proteins und ρ -Crystallin (Abb. 32) macht klar, daß diese alle in eine Proteinfamilie zusammengefaßt werden müssen. Es ist andererseits offensicht-

lich, daß das ρ -Crystallin in der Vertebratenlinse eine andere Funktion erfüllen muß als z.B. das GCY-Protein in Hefe. Dieser scheinbar paradoxe Umstand wurde durch Ergebnisse in der jüngsten Zeit aufgeklärt (Wistow et al., 1987; Wistow & Piatigorsky, 1987). Die majoren Proteinkomponenten der Augenlinse von Säugern sind α , β und γ -Crystalline. Andere Vertebraten besitzen daneben häufig weitere taxonspezifische majore Proteine, wie z.B. δ -Crystallin (in Vögeln und Reptilien), ϵ -Crystallin (in den meisten am Wasser lebenden Vögeln), τ -Crystallin (im Neuenauge, sowie in einigen Vögeln, Reptilien und Fischen) und letztlich das ρ -Crystallin im Frosch. Crystalline (die zwischen 20-60% des Naßgewichts der Augenlinse ausmachen können) sind lösliche, sehr stabile, strukturelle Proteine der Augenlinse. Die Evolution der Augenlinse scheint nicht durch Konstruktion neuer Proteinkomponenten, sondern durch Auswahl (und teilweise Veränderung) bereits existierender erfolgt zu sein. α -, β - und γ -Crystalline sind wahrscheinlich aus Genduplikationen hervorgegangen. Die normale Funktion des Genprodukts wurde hierbei (an einer Kopie) verändert und auf die Linsenumgebung spezialisiert. Die taxonspezifischen Crystalline (δ , ϵ , τ und vielleicht auch ρ) entsprechen dagegen wahrscheinlich in anderen Geweben funktionale Enzyme, die im Augenlinsenorgan überexprimiert werden. So stellt ϵ -Crystallin eine funktionstüchtige Laktatdehydrogenase (offenbar identisch mit LDH-B4) dar (Wistow et al., 1987). δ -Crystallin ist annähernd zu 70% (bzw. 55%) mit der Argininosuccinatlase aus Mensch (bzw. Hefe) identisch, ähnliches gilt für τ -Crystallin mit ausgeprägter Homologie und strukturellen Ähnlichkeiten zur Enolase aus Mensch und Hefe (Wistow & Piatigorsky, 1987). ρ -Crystallin - mit hoher Homologie zu Aldo/Ketoreduktasen und zum GCY-Genprodukt aus dem niedrigen Eukaryonten *Saccharomyces* - ist scheinbar in ähnlicher Weise als strukturelles Protein der Froschaugenlinse rekrutiert worden.

D) VERGLEICHENDE DISKUSSION DER ANALYSIERTEN GENSTRUKTUREN

Die Genome von Prokaryonten und Eukaryonten weisen große Unterschiede hinsichtlich der Kompaktheit der genetischen Information bzw. der Organisation der Transkriptionseinheiten auf den Chromosomen auf. Im Prokaryonten *E. coli* liegen die Gene bzw. die polycistronischen Transkriptionseinheiten grundsätzlich sehr eng benachbart. Die intergenischen Bereiche sind extrem kurz (Lindahl & Zengel, 1982). Die Gene höherer Eukaryonten sind dagegen weit verstreut im Genom mit riesigen, nicht transkribierten intergenischen Bereichen (Efstratiadis et al., 1980). Die Größe des Genoms von *Saccharomyces cerevisiae* beträgt ca. 2.3×10^7 bp, das Genom ist also lediglich 5mal größer als das *E. coli*- und 100mal kleiner als das menschliche Genom. Die Untersuchung der Gesamttranskription ergab, daß ungefähr 40-50% des Hefegenoms unter normalen Wachstumsbedingungen exprimiert wird (Hereford & Rosbash, 1977), ganz im Gegensatz zu höheren Eukaryonten mit nur 1-3% (Lewin, 1980). Die Analyse größerer genomischer Bereiche in Hefe offenbarte - wie erwartet -, daß die Gene dicht gedrängt aneinander angeordnet sind, also hinsichtlich der Kompaktheit des Genoms eher *E. coli* als anderen (höheren) Eukaryonten ähneln. So liegen z.B. in der sogenannten COR-Region innerhalb von 8 kb insgesamt 6 vollständige Gene: CYC1, UTR1, UTR3, OSM1, tRNA^{Ala} und RAD7 (Barry et al., 1987). Ein weiteres gut dokumentiertes Beispiel ist die Region um das HIS3-Gen (Struhl & Davis, 1981). Hier sind innerhalb einer 10.1 kb-Region ebenfalls 6 Gene lokalisiert (HIS3, PET56, DED1 und drei noch nicht identifizierte Gene).

Auf den in der vorliegenden Arbeit charakterisierten genomischen Klonen UHC3-12 und UHC15-2 befinden sich ebenfalls mehrere Gene. Auf UHC3-12 liegen innerhalb einer 3.1 kb-Region die Gene HTB1, HTA1 und AKY2, wobei der gemeinsame Promoterbereich des Histon H2A-1 und H2B-1 Genpaars 800 bp und der

intergenische Bereich zwischen HTA1 und AKY2 557 bp beträgt (Hereford et al., 1979; diese Arbeit).

Auf UHC15-2 (3.7 kb) konnten mindestens zwei Gene, PFY (codiert für Profilin) und GCY (codiert vermutlich für eine Aldo/Keto-Reduktase), identifiziert werden. Für einen weiteren (nicht vollständigen) Leserahmen, ORFre, konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß dieser ebenfalls ein in Hefe exprimiertes Gen darstellt. (Die Fusion des präsumptiven Promoter- und 5'-terminalen Bereichs der codierenden Sequenz von ORFre an die codierende lacZ-Sequenz und Transformation dieses Fusionsgens in Hefe offenbarte eine signifikante β -Galaktosidase-expression.) PFY und GCY besitzen eine gemeinsame 3'-Region, diese ist mit 245 bp ausgesprochen kurz. Der intergenische Bereich von GCY und (dem präsumptiven Gen) ORFre beträgt 870 bp und enthält die Promoterregionen der beiden Gene. Am anderen Ende des Klons UHC15-2 wurde ein weiterer unvollständiger Leserahmen festgestellt (ORFl1). Das Stopcodon von ORFl1 ist 288 bp vom Startcodon des PFY-Gens entfernt. Ob ORFl1 allerdings ein Gen darstellt (das für ein an geladenen Aminosäuren reiches Protein codiert) oder ob es sich bei der DNA-Sequenz um eine strukturelle Komponente mit hohem Puringehalt im 5'-oberhalb des PFY-Gens liegenden Bereichs handelt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt.

Der genomische Klon QHC7 stellt einen Teil der über 100fach reiterierten 9.1 kb rRNA-Wiederholungseinheit (codierend für 18S, 5.8S und 25S sowie für 5S rRNA) dar. Hierbei liegt das gesamte 5S rRNA-Gen (von der RNA-Polymerase III transkribiert) zwischen dem majoren Promoterelement und der dazugehörigen DNA-Region, die zur Bildung des gemeinsamen 37 S Primärtranskriptes der 18S, 5.8S und 5S rRNA führt (Elion & Varner, 1984).

Der kompakte Aufbau des Hefegenoms erfordert zwangsläufig umfangreiche Kontrollmechanismen der Initiation der Transkription, um benachbarte Gene mit verschiedenen Funktionen unterschiedlich exprimieren zu können. Bis auf wenige Ausnahmen liegen Gene, die für Enzyme eines gemeinsamen Biosyntheseweges

codieren, oder Gene, die unter einer gemeinsamen Transkriptionskontrolle stehen könnten, in *Saccharomyces* wie in anderen Eukaryonten nicht gekoppelt im Genom vor. Ausnahmen hiervon sind z.B. der GAL-Cluster (mit den Genen GAL1, 7, 10) (St. John & Davis, 1981), die beiden Histon H2A- und H2B-Genpaare (Hereford et al., 1979) und die Gene für die ribosomalen Proteine rp28 und S16A (Molenaar et al., 1984). Meistens aber liegen Gene mit zum Teil höchst unterschiedlichen Expressionsmustern auf engstem Raum vor. In der Umgebung des HIS3-Gens liegen beispielsweise weitere fünf Gene (darunter DED1 und PET56, s.o.), die für nicht verwandte Funktionen in der Zelle codieren (Struhl & Davis, 1981; Struhl, 1985). DED1 wird unter normalen Bedingungen 5mal stärker transkribiert als die anderen Gene. Bei Aminosäuremangel hingegen steigt die Transkriptionsrate von HIS3 ungefähr um das 3fache, während die anderen Gene dadurch unbeeinflusst bleiben.

Ähnliche Verhältnisse wurden auch auf den genomischen Klonen UHC3-12 und UHC15-2 aufgefunden. AKY2, das für die (mitochondriale) Adenylatkinase codiert, wird konstitutiv transkribiert, während das benachbarte Histon-Genpaar unter Zellzykluskontrolle zu Beginn der S-Phase exprimiert wird (Klon UHC3-12). Auf UHC15-2 befinden sich das Profilin-Gen (PFY), das GCY-Gen und ORFre, ein unvollständiger Leserahmen, der wahrscheinlich ein Gen darstellt. PFY wird konstitutiv exprimiert. GCY und ORFre teilen sich eine gemeinsame Promoter-region (870 bp, vergleichbar mit dem intergenischen Bereich von HTA1 und HTB1). Trotzdem wird die Transkription von GCY durch Galaktose aktiviert, während die relativ geringe Expression von ORFre unter den untersuchten Bedingungen hingegen konstitutiv ist.

Die Kontrolle der Expression regulierter Gene wird durch die Wechselwirkung trans-aktiver Regulatorproteine mit cis-wirksamen Sequenzen (in Hefe: UAS-Elemente) ausgeübt. Für eine effiziente Expression sind zudem TATA-Elemente (Konsensus: TATAAA) notwendig, die in variablen Abständen von den Initiationsstellen der Transkription (40 bis 120 bp) positioniert sind. Die

UAS-Elemente weisen Ähnlichkeiten zu Enhancern in Säugerzellen auf, indem sie orientierungsunabhängig und in einem variablen Abstand zur Initiationsstelle(n) wirken können. Im Gegensatz zu Enhancerelementen in Säugerzellen aktivieren UAS-Sequenzen in Hefe die Transkription jedoch nicht, wenn sie 3'-unterhalb der Initiationsstelle(n) lokalisiert sind. Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, daß ein UAS_o-Element aus Hefe in HeLa-Zellen als Enhancer wirkt (also auch, wenn dieses Element 3'-unterhalb des Markergens positioniert ist), falls gleichzeitig das GAL4-Genprodukt in diesen Zellen vorhanden ist. Zudem wurde nachgewiesen, daß dieselben Domänen in den Aktivatorproteinen, die für die Aktivierung der Transkription in Hefe verantwortlich sind, in Säugerzellen den gleichen Effekt auslösen (Webster et al., 1988). Der molekulare Mechanismus der Aktivierung scheint also von der Hefe bis zum Menschen konserviert zu sein. In Hefe ist jedoch eine Beschränkung der Wirkung der UAS-Elemente festzustellen: Sie müssen 5'-oberhalb der Gene positioniert sein und wirken (bidirektional) nur auf die unmittelbar benachbarten Gene. Dies ermöglicht der Hefe auf einem relativ engen Raum viele Gene mit unterschiedlichen Expressionsmustern anzuordnen.

Zudem scheint die Hefe über einen Mechanismus zu verfügen, die bidirektionale Wirkung der jeweiligen UAS-Elemente zu unterbinden, wenn Gene mit gemeinsamer Promoterregion unterschiedlich exprimiert werden. HIS3 und PET56 sind sehr eng benachbarte Gene (Die Initiationsstellen der Transkription sind nur ca. 200 bp voneinander getrennt). In der gemeinsamen Promoterregion treten 2 UAS-Elemente auf, die zusammen mit dem Aktivator GCN4 die ca. 3fache Stimulation der HIS3-Expression bei Aminosäuremangel bewirken (Struhl & Davis, 1981; Hope & Struhl, 1985). Obwohl diese regulatorischen UAS-Sequenzen bidirektional wirken und in variablen Abständen 5'-oberhalb der TATA-Elemente positioniert sein können (Hinnebush et al., 1985), wird die Transkription des PET56-Gens unter Mangelbedingungen nicht aktiviert (Struhl und Davis, 1981). Auch die Insertion von UAS_o-Elementen 5'-oberhalb der TATA-Elemente des

PET56-Gens (Struhl, 1986) führt, im Gegensatz zu analogen Experimenten mit dem CYC1- und HIS3-Gen (Guarente et al., 1982; Struhl, 1984), nicht zu einer galaktoseabhängigen Expression. Konstitutive und induzierbare Promotoren scheinen daher einen voneinander grundsätzlich verschiedenen Aufbau zu besitzen: Während UAS-Elemente regulierter Gene (z.B. CYC1, HIS3, HTA1/HTB1), in Promoterregionen anderer regulierter Gene inseriert, diese unter die jeweilige fremde Transkriptionskontrolle bringen, ist das gleiche Element vor konstitutiv exprimierten Genen ohne Wirkung. Die genaue Analyse des intergenischen Bereiches des HIS3/PET56-Genpaares offenbarte, daß beide Gene unterschiedliche TATA-Elemente zu besitzen scheinen (Struhl, 1986). Die Sequenz TATAAA, die im Promoterbereich des HIS3-Gens auftritt, nimmt wahrscheinlich die durch die UAS-Sequenz ausgelösten regulatorischen Signale auf, während TATA-ähnliche Elemente (wie TATACA, TATAGA und CATAAA) sowohl im HIS3- wie auch PET56-Promoterbereich für die konstitutive (Basal-) Expression verantwortlich sein sollen. Sowohl die Deletion der TATAAA-Sequenz oberhalb des HIS3-Gens als auch Punktmutationen innerhalb dieser eliminieren die Induzierbarkeit der Transkription unter Mangelbedingungen (Struhl, 1986).

Der Vergleich mit den regulierten Genen HTA1 und GCY zeigt, daß diese ebenfalls ein, nach dem Konsensus perfektes, TATA-Element aufweisen (HTA1: Pos. -174 bis -167; GCY: -116 bis -111), während die konstitutiv exprimierten Gene AKY2 und PFY (auch ORFre) lediglich Variationen davon in der Promoterregion enthalten (obwohl sowohl AKY2 wie auch PFY relativ hoch exprimiert werden). Das Auftreten zweier TATA-Elementklassen könnte daher auch die unterschiedlichen Expressionsmuster der beiden Promoter/lacZ-Fusionsgene GCY/lacZ und ORFre/lacZ in Hefe erklären: während die Expression von GCY bei Wachstum in Galaktose im Zusammenspiel des UAS_g-Elements mit dem TATA-Element TATAAA aktiviert wird, bleibt die Transkription von ORFre aufgrund des Fehlens eines TATA-Elements dieser Klasse - trotz des UAS_g-Elements im Promoterbereich - konstant.

Promoteruntersuchungen wurden in Hefe größtenteils mit Genen durchgeführt, die unter verschiedenen Bedingungen unterschiedlich exprimiert werden. Die meisten Gene werden in Hefe jedoch konstitutiv (mit 1-2 mRNA-Molekülen pro Zelle) transkribiert (Struhl & Davis, 1981). Während also recht viel über die komplexen Mechanismen der Transkriptionskontrolle regulierter Gene bekannt ist, sind die Promoterstrukturen der Mehrzahl der Gene kaum untersucht. Eine Klasse von 'Upstream' Elementen, die die Expression konstitutiv transkribierter Gene beeinflusst, stellen Poly(dA-dT)-Sequenzen dar. So wurde gezeigt, daß die Deletion eines Poly(dA-dT)-Bereichs oberhalb der jeweiligen TATA-Elemente im gemeinsamen Promoterbereich von HIS3/PET56 (15 von 17 b [88%] entsprechen einem dT auf dem codierenden Strang des HIS3-Gens) eine Reduktion der konstitutiven Basalexpression beider Gene auf 10-20% der Wildtyp Expression bewirkt. Auch das gleichfalls konstitutiv exprimierte DED1-Gen besitzt eine solche Region (28 von 34 b sind dT [82%] auf dem codierenden Strang). Die Deletion dieses Bereichs führt ebenfalls zu der Reduktion der Transkription um ca. das 7fache (Struhl, 1985). Poly(dA-dT)-Bereiche bilden eine besondere Form der B-DNA Helix aus: statt 10.6 b liegen hier nur 10.0 b pro Windung vor. Die Helix weist eine sehr schmale flache Rinne ('minor groove') auf und ist an solchen Stellen häufig gekrümmt oder geknickt. Möglicherweise sind (dA-dT)-Sequenzen *in vivo* mehr oder weniger nukleosomenfrei (Prunell, 1982; Koo et al., 1986; Alexeev et al., 1987). Die Poly(dA-dT)-Sequenzen (oder daran gebundene Proteine, die die Ausbildung einer normalen Nukleosomenstruktur verhindern) bewirken in Hefe wahrscheinlich die Zugänglichkeit des Promoterbereichs für den Polymerasekomplex, ohne daß direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen auftreten (Chen et al., 1987).

Unmittelbar oberhalb des TATA-Elements des AKY2-Gens (Pos. -153 bis -176) ist eine zu den oben beschriebenen Elementen vergleichbare Sequenz positioniert (18 von 24 b sind dT [75%]). Ob allerdings diese Region alleine für die konstitutive Expression von AKY2 verantwortlich ist, ist fraglich. G. Strobel

(pers. Mitteilung) konnte zeigen, daß die Deletion der eher GC-reichen Region von Pos. -200 bis -410 die Expression des Gens auf ein Zwanzigstel reduziert. Allerdings sind Experimente, bei denen der deletierte Bereich durch ein gleich großes DNA-Fragment ersetzt wird, noch nicht abgeschlossen. Es ist nicht nämlich auszuschließen, daß der Terminationsbereich der Transkription des mit AKY2 eng benachbarten Gens HTA1 Auswirkungen auf die Expression von AKY2 ausübt, wenn dieser zu nah an den AKY2-Promoter positioniert wird.

Besonders auffällig ist das Auftreten zweier Poly(dA-dT)-Bereiche in der gemeinsamen Promoterregion von GCY und ORFre. Diese bestehen aus je 13 b dA (codierender Strang von ORFre) und sind lediglich 21 bp voneinander getrennt (Pos. -285 bis -297 und -319 bis -331 mit ATG-Startcodon von ORFre als +1), von der codierenden Sequenz des GCY-Gens sind diese Sequenzen 540-600 bp entfernt (ca. 200 bp 5'-oberhalb des UAS₆-Elements). Eine Computeranalyse der DNA-Sequenzen der bekannten Hefegene zeigt, daß 13 b (und größere) dA- bzw. dT-Homopolymersequenzen sowie verwandte Sequenzen (z.B. 15 von 17 b entsprechen einem dA bzw. dT, wie im Falle des Elements des Genpaares HIS3/PET56) sehr viel häufiger in Promoterregionen der Hefegene auftreten, als statistisch zu erwarten wäre (Struhl, 1985; eigene unveröffentlichte Ergebnisse). Die beiden Poly(dA-dT)-Blöcke im intergenischen Bereich von GCY und ORFre sorgen möglicherweise für eine konstitutive Expression von ORFre und für die recht hohe Basalexpression des galaktoseregulierten GCY-Gens. Deletionen der Poly(dA-dT)-Blöcke in den lacZ-Fusionsgenen von ORFre und GCY sollten Aufschluß über die mögliche Funktion dieser Sequenzen in dem Genpaar liefern.

Die Analyse des Promoterbereichs des PFY-Gens offenbart keine ausgeprägten (dA-dT) Homopolymersequenzen oberhalb des TATA-Elements. Für die moderat hohe Expression dieses Gens spielt hier andererseits unter Umständen ein ca. 250 bp langes purinreiches Element 300 bp 5'-oberhalb des Initiationscodons eine Rolle. Wie Poly(dA-dT)-Sequenzen können auch Polypurine eine besondere DNA-

Struktur ausbilden (Cantor & Efstratiadis, 1984) und dadurch eine bessere Zugänglichkeit für die Transkriptionsmaschinerie ermöglichen.

Der kompakte Aufbau des Hefegenoms wird nicht nur von der engen Anordnung der Gene und der daraus zwangsläufig folgenden komplexen Regulationsmechanismen der Genexpression dokumentiert. Auch das Fehlen jeglicher, für höhere Eukaryonten typischer (inaktiver) Pseudogene und die sehr geringe Anzahl intronhaltiger Gene (bisher lediglich 25) reflektiert möglicherweise die Konservierung eines kompakten Genoms, die eine effiziente Replikation der DNA des schnell wachsenden Mikroorganismus *Saccharomyces* gewährleistet (Barry et al., 1987). Nach der Identifizierung einer reversen Transkriptaseaktivität wird für Hefe die Möglichkeit diskutiert, daß diese Aktivität in der Zelle dazu führte, intronhaltige Gene gegen prozessierte, aber durch homologe Rekombination aktive Pseudogene auszutauschen (Boeke et al., 1985; Fink et al., 1986). Dies würde aber bedeuten, daß möglicherweise die wenigen Introns, die noch in Hefegenen (darunter das in dieser Arbeit charakterisierte PFY-Gen, das für Profilin codiert) vorhanden sind, für die Funktion dieser Gene eine Rolle spielen. Tatsächlich scheinen sich zwei große Gruppen intronhaltiger Gene herauszukristallisieren. Die ribosomalen Proteingene sowie die - bis jetzt identifizierten - Gene, die für Cytoskelett Komponenten codieren, enthalten mit wenigen Ausnahmen ein Intron. Neben diesen gibt es lediglich noch vier weitere Gene, die keiner dieser beiden Gruppen zuzuordnen sind (Tab. 7). Die Eliminierung des Introns des Aktgens zeigt allerdings *in vivo* keinen Wachstumsnachteil im Vergleich zu einem isogenen Hefestamm, der das Wildtyp Aktgen enthält (H. Domdey, Max Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, pers. Mitteilung). Eine biologische Relevanz der scheinbar in bestimmten Genfamilien vorkommenden Introns kann diesen daher (noch) nicht zugeordnet werden.

Die Termination der Transkription ist in höheren Eukaryonten (bei Poly(A)RNA) von der weiteren Prozessierung und Polyadenylierung des 3'-Endes getrennt. Die Transkription kann sich bis zu 4 kb hinter das letzte Poly(A)-

Signal (AATAAA) erstrecken. Die Termination der Transkription ist eher unspezifisch, während die Prozessierung und Polyadenylierung der RNA an genau definierten Stellen erfolgt (Platt, 1986). In Hefe dagegen ist die Poly(A)-Anheftung mit großer Wahrscheinlichkeit direkt mit der Termination der Transkription gekoppelt. Jede mRNA wird an der Terminationsstelle ohne weitere Prozessierungsschritte polyadenyliert (Zaret & Sherman, 1982). Die Terminationsstelle scheint durch spezielle Sequenzelemente bestimmt zu werden, an die wahrscheinlich trans-aktive Proteine binden und den Abfall der RNA-Polymerase bewirken (Kotval et al., 1983). Zwei Motive wurden für die effiziente Termination in Hefe vorgeschlagen: TTTTATA (Henikoff et al., 1983; Henikoff & Cohen, 1984) und das aus drei Teilen bestehende Element TAG...TAGT oder TATGT...TTT (Zaret & Sherman, 1982). Die meisten in dieser Arbeit analysierten Terminationsregionen scheinen auf eine Summe des ersten mit dem zentralen Motiv des zweiten Elements hinzudeuten (Tab. 3). In der unmittelbaren Nähe weniger gut mit dem Konsensus übereinstimmender Terminationssignale sind häufig kurze Palindromstrukturen aufzufinden.

Der intergenische Bereich zwischen dem 3'-Ende des HTA1- und dem 5'-Ende des AKY2-Gens beträgt lediglich 557 bp, in dieser Region muß also die Termination der Transkription des HTA1-Gens erfolgen, aber auch der Promoter und Initiationsbereich der Transkription des AKY-Gens liegen. Durch die enge Nachbarschaft der Gene im Genom der Hefe ist wahrscheinlich eine effiziente Termination der Transkription notwendig, im Gegensatz zu höheren Eukaryonten, die viel mehr Platz auf ihrem Genom besitzen. Dies wird auch bei den benachbarten Genen GCY und PFY deutlich. Der intergenische Bereich dieser beiden Gene beträgt lediglich 245 bp. Das 3'-Ende des cDNA-Klons von PFY befindet sich knapp 3'-unterhalb des Stoppcodons des GCY-Gens. Würde die Transkription weit in die codierenden Regionen der Gene hinein erfolgen, würden große Teile der Transkripte solcher Genpaare zueinander komplementär sein und die Expression der Genprodukte eventuell behindern. Das CYC1- und ein weiteres

Gen (UTR1) mit einer noch unbekannten Funktion besitzen ebenfalls eine gemeinsame Terminationsregion. Diese beiden Gene scheinen ein gemeinsames Terminationssignal zu besitzen, denn die Deletion einer 38 bp-Region, die das Motiv TTTTATAGT enthält, führt zu unphysiologisch langen mRNAs mit heterologen Enden (Zaret & Sherman, 1982). Interessanterweise ist zwischen dem PFY- und dem GCY-Gen ein entsprechendes Motiv (TTTTATATGT) lokalisiert. Aufgrund des extrem kurzen intergenischen Bereichs zwischen GCY und PFY sollte die Identifizierung des genauen Mechanismus der Termination der Transkription z.B. durch *in vitro*-Mutagenese erheblich erleichtert sein.

Die in dieser Arbeit charakterisierten Gene stellen geeignete Genstrukturen dar, um möglicherweise mehrere offene Fragen hinsichtlich des Mechanismus der Initiation und der Termination der Transkription in Hefe zu beantworten. Der extrem kurze intergenische Bereich der beiden Gene PFY und GCY sollte die Identifizierung von Terminationsstrukturen (z.B. DNA-bindende Proteine und deren Bindungsstellen) ermöglichen. Ebenso sollte der abgrenzbare, recht kurze Promoterbereich des AKY2-Gens (3'-unterhalb der codierenden Sequenz des HTA1-Gens, 557 bp) die Suche nach Elementen der konstitutiven Expression des Gens erleichtern. Die weitere Analyse des purinreichen Elements des PFY-Gens weist dieses möglicherweise als ein neues Promoterelement aus, das für die konstitutive Expression einiger Gene verantwortlich ist. Das präsumptive Gen ORFre und das Gen GCY stellen ein weiteres Beispiel eines Genpaares dar, das trotz einer gemeinsamen Promoterregion unterschiedlich reguliert wird. Durch *in vitro*-Mutagenese (z.B. Änderung einer nicht perfekten TATA-Box von ORFre zum Konsensus TATAAA, Inversion des UAS_G-Elements oder Deletion der Poly(dA-dT)-Blöcke) kann unter Umständen geklärt werden, warum die Transkription von ORFre konstitutiv, die des GCY-Gens jedoch positiv durch Galaktose reguliert wird.

E) ZUSAMMENFASSUNG

Das promoterähnliche Fragment 5'-oberhalb des 25S rRNA-Gens

Das genomische Fragment aus pQHC7 ist Teil des rDNA-Clusters in Hefe. Es enthält u.a. die vollständigen 5.8S und 25S rRNA-Gene. Dem 25S rRNA-Gen geht ein TATA-ähnliches Element voran. Wenn ein 'Promoterfragment' aus der Region 5'-oberhalb des 25S rRNA-Gens vor ein promoterloses lacZ-Gen, das ein ATG-Startcodon bereitstellt, kloniert wird, bewirkt es die β -Galaktosidaseexpression in *E. coli* und Hefe. In *E. coli* wurden zwei Initiationsstellen der Transkription des Fusionsgens beobachtet. Diese liegen 12 bp auseinander. Die Bestimmung der 5'-Enden der in Hefe gebildeten Transkripte des Fusionsgens durch Primerelongation mit einem lacZ-spezifischen Primer ergaben eine singuläre Initiationsstelle 63 bp unterhalb des TATA-ähnlichen Elements, ungefähr 53 bp 5'-oberhalb des 25S rRNA-Gens. Ein dieser Position entsprechendes, jedoch ziemlich schwaches Signal konnte *in vivo* beobachtet werden, indem Gesamt-RNA aus nichttransformierten Hefezellen mit einem 25S rRNA-spezifischen DNA-Fragment als Primer für den Elongationsversuch eingesetzt wurde. Diese Ergebnisse lassen daher vermuten, daß das PolII-promoterähnliche Element auch *in vivo* die Transkription an dieser Stelle dirigiert. Eine regulatorische Funktion dieses Transkript konnte nicht nachgewiesen werden. Die Expression der β -Galaktosidase des Fusionsgens in Hefe zeigt keine signifikanten Unterschiede bei Wachstum der transformierten Hefezellen mit verschiedenen C-Quellen und erfolgt scheinbar hämunabhängig.

Das Adenylatkinase-Gen (AKY2)

Die Analyse des genomischen Hefeklons pUHC3-12 ergab, daß in unmittelbarer Nähe des Histon H2B-1 und H2A-1 Genpaares (HTB1/HTA1) das AKY2-Gen lokalisiert ist. Der intergenische Bereich zwischen HTA1 und AKY2 ist mit

557 bp verhältnismäßig kurz. HTA1 und AKY2 werden vom gleichen Strang transkribiert. AKY2 liegt als singuläre Genkopie pro haploidem Genom auf Chromosom IV. Der nichttranslatierte 'Leader'-Bereich der AKY2-Transkripte ist relativ kurz: die majoren Initiationsstellen der Transkription liegen 23 bis 60 bp vom Startcodon entfernt. Die aus der DNA-Sequenz abgeleitete Primärstruktur des Enzyms ist mit der der bereits veröffentlichten der Hefeadenylylkinase (YAK) größtenteils identisch (Tomasselli et al., 1986). Lediglich die zwei N-terminalen Aminosäuren (Met-Ser) scheinen posttranslational abgespalten, die C-terminale Aminosäure dagegen modifiziert (Asp → Asn) zu werden. YAK offenbart eine hohe Homologie zu den drei Isoformen der Adenylylkinasen (AK1-3) aus Säugern (und zum *E. coli*-Enzym, ECOAK). Im Vergleich zu dem cytosolischen Protein (AK1) weisen jedoch alle anderen Isoformen (AK2, aus dem Intermembranraum der Mitochondrien; AK3, aus der Mitochondrienmatrix; ECOAK und YAK) eine hochkonservierte, aus 31 Aminosäuren bestehende Insertion im mittleren Abschnitt des Proteins auf. Die Homologie von AK2 und YAK ist mit Abstand am höchsten ausgeprägt. Zellen, in denen das Strukturgen gegen ein disrumpiertes, nichtfunktionales Gen ausgetauscht wurde, waren lebensfähig. Die Inaktivierung des AKY2-Gens führt aber zu atmungsinkompetenten Zellen, auf die - zumindest partielle - Lokalisation von YAK in den Mitochondrien hindeutend. Da die Adenylylkinasefunktion für die Zelle essentiell ist, muß neben YAK noch ein weiteres Isoenzym in der Hefezelle vorhanden sein, das aus AMP ADP bzw. ATP herstellen kann. Die Expression von AKY2 (gemessen als exprimierte β -Galaktosidaseaktivität eines AKY-Promoter/lacZ-Fusionsgens in Hefe) ist unter allen untersuchten Bedingungen konstitutiv.

Das Profilin-Gen (PFY)

PFY, auf dem genomischen Klon pUHC15-2 enthalten, hat eine codierende Kapazität (126 Aminosäuren) für ein Protein mit dem Molekulargewicht von 13340. Die abgeleitete Primärstruktur weist eine ausgeprägte Homologie zum

Profilin, einem aktinbindenden Protein, aus *Acanthamoeba* und partiell zu den Profilinen aus Mensch und Rind (lediglich am N-Terminus) auf. Wie das *Acanthamoeba*-Protein, besitzt das Profilin aus *Saccharomyces* am C-Terminus einen kurzen Sequenzabschnitt, der homolog zu Motiven anderer Aktin bindender Proteine, wie Fragmin und Gelsolin ist. Das PFY-Gen enthält ein 209 bp langes Intron, das das fünfte Triplett der codierenden Sequenz unterbricht. Die Identifizierung des Introns erfolgte durch Vergleich mit einem entsprechenden cDNA-Klon. Die Sequenzanalyse dieses cDNA-Klons deckte auch ein mögliches 3'-Ende der PFY-mRNA auf (223 bp 3'-unterhalb des Stopcodons von PFY, 22 bp vom Stopcodon des GCY-Gens entfernt). Drei majore Startpunkte der Transkription (13, 17 bzw. 41 bp vom ATG-Startcodon entfernt) wurden festgelegt. In der flankierenden Region des PFY-Gens (300-700 bp 5'-oberhalb des Startcodons) ist eine extreme Purin/Pyrimidinasymmetrie zu beobachten. Die Bedeutung dieses Bereichs ist noch unklar. Durch die Fusion eines PFY-Promoterfragments an die codierende Sequenz des lacZ-Gens und Transformation dieses Fusionsgens in Hefe konnte die Expression von PFY untersucht werden. Die verschiedenen Tests ergaben keine Hinweise auf eine etwaige Expressionkontrolle, die gemessenen Werte unterschieden sich unter den verschiedenen Bedingungen nicht signifikant. Die Expression von PFY scheint daher wie AKY2 konstitutiv zu sein. Die Funktion des Profilins ist für die Sporulation und/oder das Zellwachstum unentbehrlich: Der Austausch einer Genkopie einer diploiden Zelle durch ein zweites disrumpiertes, nichtfunktionales Allel führt zu rezessiver Letalität: Die vier Sporen der pfy/PFY-Mutante zeigen eine 2:2 Aufspaltung (letal/vital).

Das GCY-Gen

Der Leserahmen des GCY-Gens codiert für ein Protein mit 312 Aminosäuren (abgeschätztes Molekulargewicht 35000). Das Protein weist eine hohe Homologie zu Aldo/Ketoreduktasen sowie zu einem taxonspezifischen, majoren Augenlinseprotein des Frosches, ρ -Crystallin, auf. Das Gen liegt als singuläre Kopie pro

haploidem Genom vor. Dennoch führt die Inaktivierung dieser Genkopie (durch Austausch des intakten gegen ein disruptiertes Allel) in haploiden Zellen zu keinem beobachtbaren Phänotyp. GCY scheint also für eine entbehrliche Funktion zu codieren. Der Abstand der Stopcodons der Leserahmen von GCY und PFY beträgt lediglich 245 bp. Die beiden majoren Initiationsstellen der Transkription wurden 44 bzw. 45 bp 5'- oberhalb des Startcodons festgelegt. Durch die Analyse eines GCY-Promoter/lacZ-Fusionsgens wurde eine umfangreiche Expressionskontrolle des GCY-Gens aufgedeckt. Die Experimente zeigen, daß Hefezellen bei Wachstum mit Galaktose als alleiniger C-Quelle GCY ungefähr 20-30fach stärker exprimieren als bei Wachstum mit Glukose. Andere Substrate, wie Glycerin, Laktat oder Raffinose, führen zu intermediärer Expression. Werden gleichzeitig Galaktose und Glukose den Zellen als C-Quelle angeboten, entspricht die Expressionsrate der mit Glukose allein. GCY scheint daher durch Galaktose aktiviert zu werden, in Gegenwart von Glukose jedoch reprimiert zu werden. Eine singuläre UAS_G-ähnliche Sequenz wurde durch Vergleich mit dem Konsensus der bekannten UAS_G-Elemente im Promoterbereich von GCY identifiziert. *In vitro*-Mutagenesen im Promoterbereich von GCY (Deletionen bzw. Veränderung des UAS_G-Elements) weisen dieses Element tatsächlich als die regulatorische Sequenz aus, die die galaktoseabhängige Transkriptionskontrolle vermittelt. Ungefähr 870 bp 5'-oberhalb des GCY-Gens wurde ein weiterer (auf pUHC15-2 allerdings unvollständig enthaltener) Leserahmen (ORFre) identifiziert. Die Fusion des 'intergenischen' Bereichs von GCY und ORFre an das lacZ-Gen in der Orientierung, in der der präsumptive N-Terminus von ORFre an die codierende Sequenz des Markergens kloniert wurde, offenbarte in Hefe eine signifikante Expressionsrate. Daher ist es wahrscheinlich, daß ORFre ein weiteres auf pUHC15-2 partiell codiertes Hefegen darstellt. Die Expression von ORFre ist - im Gegensatz zu der des GCY-Gens - unabhängig von der angebotenen C-Quelle.

F) LITERATUR

Algeri, A.A., Bianchi, L., Viola, A.M., Puglisi, P.P. and Marmiroli, N. (1981)

IMP1/impl: a gene involved in the nucleo-mitochondrial control of the galactose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*

Genetics 97, 27-44

Ampe, C., Vandekerckhove, J., Brenner, S.L., Tobacman, L. and Korn, E.D. (1985)

The amino acid sequence of *Acanthamoeba* profilin

J. Biol. Chem. 260, 834-840

Ampe, C. and Vandekerckhove, J. (1987)

The F-actin capping proteins of *Physarum polycephalum* cap42(a) is very similar, if not identical, to fragmin and is structurally and functionally very homologous to gelsolin; cap42(b) is *Physarum* actin

EMBO J. 6, 4149-4157

Ampe, C., Sato, M., Pollard, T.D. and Vandekerckhove, J. (1988a)

The primary structure of the basic isoform of *Acanthamoeba* profilin

Eur. J. Biochem. 170, 597-601

Ampe, C., Markey, F., Lindberg, U. and Vandekerckhove, J. (1988b)

The primary structure of human platelet profilin: reinvestigation of the calf spleen profilin sequence

FEBS Lett. 228, 17-21

Anderson, S., Marks, C.B., Lazarus, R., Miller, J., Stafford, K., Seymour, J., Light, D., Rastetter, W. and Estell, D. (1985)

Production of 2-keto-L-gulonate, an intermediate in L-ascorbate synthesis, by a genetically modified *Erwinia herbicola*

Science 230, 144-149

Ansorge, W. and Barker, R. (1984)

System for DNA sequencing with resolution up to 600 base pairs

J. Biochem. Biophys. Meth. 9, 33-48

Bagnasco, S., Balaban, R., Fales, H., Yang, Y.-M., Burg, M. (1986)

Identification of intracellular organic osmolytes in renal inner medulla

J. Biol. Chem. 261, 5872-5877

Bajwa, W., Meyhack, B., Rudolph, H., Schweingruber, A. and Hinnen, A. (1984)
Structural analysis of the two tandemly repeated acid phosphatase genes in yeast

Nucleic Acids Res. 12, 7721-7739

Baldari, C. and Cesareni, G. (1985)

Plasmids pEMBLV: new single-stranded vectors for the recovery of yeast DNA sequences

Gene 35, 27-32

Bandlow, W. (1972)

Membrane separation and biogenesis of the outer membrane of yeast mitochondria

Biochim. Biophys. Acta 282, 105-122

Bandlow, W. and Bauer, P. (1975)

Separation and some properties of the inner and outer membranes of yeast mitochondria

Meth. Cell. Biol. 17, 311-333

Bandlow, W., Strobel, G., Zoglowek, C., Oechsner, U. and Magdolen, V. (1988)

Yeast adenylate kinase (AKY2) is active simultaneously in mitochondria and cytoplasm and is indispensable for non-fermentative growth
eingereicht zur Veröffentlichung

Bard, M., Woods, R.A. and Haslam, J.M. (1974)

Porphyrin mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: correlated lesions in sterol and fatty acid biosynthesis

Biochem. Biophys. Res. Comm. 56, 324-330

Barker, W.C., Hunt, L.T., Orcutt, B.C., Gerorge, D.G., Veh, L.S., Chen, H.R., Blomquist, M.C., Johnson, G.C. and Dayhoff, M.O. (1983)

In: Atlas of Protein Sequence and Structure, Protein Data Base, vol.7, National Biochemical Research Foundation, Washington, DC.

Barry, K., Stiles, J.I., Pietras, D.F., Melnick, L. and Sherman, F. (1987)

Physical analysis of the COR region: a cluster of six genes in *Saccharomyces cerevisiae*

Mol. Cell. Biol. 7, 632-638

Bayev, A.A., Georgiev, O.J., Hadjiolov, A.A., Nikolaev, N., Skryabin, K.G. and Zakharyev, V.M. (1981)

The structure of the yeast ribosomal RNA genes. 3. Precise mapping of the 18S and 25S rRNA genes and structure of the adjacent regions

Nucleic Acids Res. 9, 789-799

Bennetzen, J.L. and Hall, B.D. (1982)

Codon selection in yeast

J. Biol. Chem. 257, 3026-3031

Berman, M. and Beckwith, J. (1979)

Use of gene fusions to isolate promoter mutants in the transfer RNA gene *tyrT* of *Escherichia coli*

J. Mol. Biol. 130, 303-315

Birnboim, H., Sederoff, R. and Paterson, M. (1979)

Distribution of polypyrimidine/polypurine segments in DNA from diverse organisms

Eur. J. Biochem. 98, 301-307

Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979)

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA

Nucleic Acids Res. 14, 3911-3925

Birnstiel, M.L., Busslinger, M. and Strub, K. (1985)

Transcription termination and 3' processing: the end is in site!

Cell 41, 349-359

Bläsi, U., Linke, R. P., Harkness, R. E., Modrow, S. and Lubitz, W. (1988)

Oligomer formation of ØX174 protein E for lysis induction of *E. coli*

J. Bacteriol., in press

- Boeke, J.D., Garfinkel, D.J., Styles, C.A. and Fink, G.R. (1985)
Ty elements transpose through an RNA intermediate
Cell 40, 491-500
- Bram, R.J. and Kornberg, R.D. (1985)
Specific protein binding to far upstream activating sequences in polymerase II promoters
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 43-47
- Bram, R.J., Lue, W.F. and Kornberg, R.D. (1986)
A GAL family of upstream activating sequences in yeast: roles in both induction and repression of transcription
EMBO J. 5, 603-608
- Breathnach, R. and Chambon, P. (1981)
Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins
Ann. Rev. Biochem. 50, 349-383
- Breeden, L. and Nasmyth, K. (1985)
Regulation of the yeast HO gene
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50, 643-650
- Brent, R. and Ptashne, M. (1985)
A eucaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor
Nature 312, 612-615
- Broach, J.R., Strathern, J.N. and Hicks, J.B. (1979)
Transformation in yeast: development of a hybrid cloning vector and isolation of the CAN1 gene
Gene 8, 121-133
- Brune, M., Schumann, R. and Wittinghofer, F. (1985)
Cloning and sequencing of the adenylate kinase gene (ack) of *Escherichia coli*
Nucleic Acids Res. 13, 7139-7151
- Bucher, P. and Trifonov, E. W. (1986)
Compilation and analysis of eukaryotic POLII promoter sequences
Nucleic Acids Res. 14, 10009-10026
- Cantor, C.R. (1981)
DNA choreography
Cell 25, 293-295
- Cantor, C. and Efstratiadis, E. (1984)
Possible structures of homopurine-homopyrimidine S1-hypersensitive sites
Nucleic Acids Res. 12, 8059-8072
- Carper, D., Nishimura, C., Shinohara, T., Dietzhold, B., Wistow, G., Craft, C., Kador, P. and Kinoshita, J.H. (1987)
Aldose reductase and ρ -crystallin belong to the same protein superfamily as aldehyde reductase
FEBS Lett. 220, 209-213

- Casadaban, M.J., Martinez-Arias, A., Shapira, S.K. and Chou, J. (1983)
 β -Galactosidase gene fusions for analyzing gene expression in *Escherichia coli* and yeast
Meth. Enzymol. 100, 293-308
- Chen, E. and Seeburg, P.H. (1985)
Supercoil sequencing: A fast and simple method for sequencing plasmid DNA
DNA 4, 165-170
- Chen, W., Tabor, S. and Struhl, K. (1987)
Distinguishing between mechanisms of eukaryotic transcriptional activation with bacteriophage T7 RNA polymerase
Cell 50, 1047-1055
- Chiu, C.S., Su, S. and Russell, P.J. (1967)
Adenylate kinase from baker's yeast: I. Purification and intracellular location
Biochim. Biophys. Acta 132, 361-369
- Choe, J., Kolodrubetz, D. and Grunstein, M. (1982)
The two yeast histone H2A genes encode similar protein subtypes
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 1484-1487
- Criss, W.E. (1970)
Rat liver adenosine triphosphate:adenosine monophosphate phosphotransferase activity
J. Biol. Chem. 345, 6352-6356
- Cumsky, M.G., Trueblood, C.E., Ko, C. and Poyton, R.O. (1987)
Structural analysis of two genes encoding divergent forms of yeast cytochrome c oxidase subunit V
Mol. Cell. Biol. 7, 3511-3519
- Darnell, J.E. (1982)
Variety in the level of gene control in eukaryotic cells
Nature 297, 365-371
- Daum, G., Böhn, P.C. and Schatz, G. (1982)
Import of proteins into mitochondria
J. Biol. Chem. 257, 13028-13033
- Davidson, W.S. (1987)
Comparison of the active sites of aldose reductase and aldehyde reductase from chicken
In Weiner, H., Flynn, T.G. (eds): "Enzymology of carbonyl metabolism: aldehyde dehydrogenase, aldo-keto reductase and alcohol dehydrogenase", A.R. Liss, New York, pp. 275-285
- Devereux, J., Haeberli, P. and Smithies, O. (1984)
A comprehensive set of sequence analysis programmes for the VAX
Nucleic Acids Res. 12, 387-395
- Dobson, M.J., Tuite, M.F., Roberts, N.A., Kingsman, A.J. and Kingsman, S.M. (1982)
Conservation of high efficiency promoter sequences in *Saccharomyces cerevisiae*
Nucleic Acids Res 10, 2625-2637

Domdey, H., Apostol, B., Lin, R., Newman, A., Brody, E. and Abelson, J. (1984)
Lariat structures are *in vivo* intermediates in yeast pre-mRNA splicing
Cell 39, 611-621

Drescher, U., Chowdhury, K. and Gruber, P. (1987)
Isolation and characterization of murine transcriptional control elements using a "shotgun" method
DNA 6, 307-316

Dumont, M.E., Ernst, J.F., Hampsey, D.M. and Sherman, F. (1987)
Identification and sequence of the gene encoding cytochrome *c* heme lyase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*
EMBO J. 6, 235-241

Dynan, W.S. (1986)
Promoters for housekeeping genes
Trends Genet. 2, 196-197

Efstathiadis, A., Posakony, J.W., Maniatis, T., Lawn, R.M., O'Connell, C., Spritz, R.A., DeRiel, J.K., Forget, B.G., Weissman, S.M., Slightom, J.L., Blechl, A.E., Smithies, O., Baralle, F.E., Shoulders, C.C. and Proudfoot, N.J. (1980)
The structure and evolution of the human β -globin gene family
Cell 21, 653-668

Egner, U., Tomasselli, A.G. and Schulz, G.E. (1987)
Structure of the complex of yeast adenylate kinase with the inhibitor Pⁱ, P⁵-di(adenosine-5'-)pentaphosphate at 2.6 Å Resolution
J. Mol. Biol. 195, 649-658

Elion, E. A. and Warner, J. R. (1984)
The major promoter element of rRNA transcription in yeast lies 2 kb upstream
Cell 39, 663-673

Fink, G.R., Boeke, J.D. and Garfinkel, D.J. (1986)
The mechanism and consequences of retrotransposition
Trends Genet. 2, 118-123

Flynn, T.G. (1982)
Aldehyde reductases: monomeric NADPH-dependent oxidoreductases with multifunctional potential
Biochem. Pharmacol. 31, 2705-2712

Frank, R., Trosin, M., Tomasselli, A.G., Schulz, G.E. and Schirmer, R.H. (1984)
Mitochondrial adenylate kinase (AK2) from bovine heart
Eur. J. Biochem. 141, 629-636

Frank, R., Trosin, M., Tomasselli, A.G., Noda, L., Krauth-Siegel, R.L. and Schirmer, R.H. (1986)
Mitochondrial adenylate kinase (AK2) from bovine heart
Eur. J. Biochem. 154, 205-211

Gallwitz, D., Halfter, H. and Mertins, P. (1987)
Splicing of mRNA precursors in yeast
In Kinghorn, J.R. (ed.), Gene structure in eukaryotic microbes
SGM Special Publication 22, pp 27-40, IRL Press, Oxford

- Giniger, E., Varnum, S. and Ptashne, M. (1985)
Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast
Cell 40, 767-774
- Godson, G.N., Fiddes, J.C., Barrell, B.G. and Sanger, F. (1978)
Comparative DNA sequence analysis of the G4 and ØX174 genomes
In: "Single Stranded DNA Phages" (Denhardt, A.T., Dressler, A. and Ray, A.S., eds) pp. 51-86.
- Gollub, E.G. and Dayan, J. (1985)
Regulation by heme of the synthesis of cytochrome c oxidase subunits V and VII in yeast
Biochem. Biophys. Res. Comm. 128, 1447-1454
- Groner, B., Hynes, M. and Phillips, S. (1974)
Length heterogeneity in the Poly(adenylic acid) region of yeast messenger ribonucleic acid
Biochemistry 13, 5378-5384
- Guarente, L. and Ptashne, M. (1981)
Fusion of *Escherichia coli* lacZ to the cytochrome c gene of *Saccharomyces cerevisiae*
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 2199-2203
- Guarente, L., Yocum, R.R. and Gifford, P. (1982)
A GAL10-CYC1 hybrid yeast promoter identifies the GAL4 regulatory region as an upstream site
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 7410-7414
- Guarente, L. (1983)
Yeast promoters and lacZ fusions designated to study expression of cloned genes in yeast
Meth. Enzymol. 101, 181-191
- Guarente, L. and Mason, T. (1983)
Heme regulates transcription of the CYC1 gene of *S. cerevisiae* via an upstream activation site
Cell 32, 1279-1286
- Guarente, L., Lalonde, B., Gifford, P. and Alani, E. (1984)
Distinctly regulated tandem upstream activation sites mediate catabolite repression of the CYC1 gene of *S. cerevisiae*
Cell 36, 503-511
- Guarente, L. (1987)
Regulatory proteins in yeast
Ann. Rev. Genet. 21, 425-452
- Guarente, L. (1988)
UASs and enhancers: common mechanism of transcriptional activation in yeast and mammals
Cell 52, 303-305
- Guiard, B. (1985)
Structure, expression and regulation of a nuclear gene encoding a mitochondrial protein: the yeast L(+)-lactate cytochrome c oxidoreductase (cytochrome b₂)
EMBO J. 4, 3265-3272

- Hamilton, R., Watanabe, C.K. and de Boer, H.A. (1987)
Compilation and comparison of the sequence context around the AUG startcodon in *Saccharomyces cerevisiae* mRNAs
Nucleic Acids Res. 15, 3581-3593
- Hampsey, D.M., Lewin, A.S. and Kohlhaw, G.B. (1983)
Submitochondrial localization, cell-free synthesis, and mitochondrial import of 2-isopropylmalate synthase of yeast
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 1270-1274
- Hanahan, D. (1983)
Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids
J. Mol. Biol. 166, 557-580
- Haritos, A.A., Blacher, R., Stein, S., Caldarella, J. and Horecker, B.L. (1985)
Primary structure of rat thymus prothymosin α
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 343-346
- Harmey, M.A. and Neupert, W. (1985)
Synthesis and intracellular transport of mitochondrial proteins
In: 'The enzymes of biological membranes' (Martonosi, A., ed), vol. 4, Plenum Publ. Co., New York, pp 431-464
- Hawley, D.K. and McClure, W.R. (1983)
Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences
Nucleic Acids Res. 11, 2237-2255
- Hay, R., Böhm, P.C. and Gasser, S. (1984)
How mitochondria import proteins
Biochim. Biophys. Acta 779, 65-87
- Hayashi, M.M., Fujimura, F.K. and Hayashi, M. (1976)
Mapping of *in vivo* messenger RNAs for bacteriophage ϕ X-174
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 3519-3523
- Hayashi, M.M., Hayashi, M. and Müller, U.R. (1983)
Role for the J-F intercistronic region of bacteriophages ϕ X174 and G4 instability of mRNA
J. Virol. 48, 186-196
- Healy, A.M., Helser, T.L. and Zitomer, R.S. (1987)
Sequences required for transcriptional initiation of the *Saccharomyces cerevisiae* CYC7 gene
Mol. Cell. Biol. 7, 3785-3791
- Heil, A., Müller, G., Noda, L., Pinder, T., Schirmer, H., Schirmer, I. and von Zabern, I. (1974)
The amino-acid sequence of porcine adenylate kinase from skeletal muscle
Eur. J. Biochem. 43, 131-144
- Henikoff, S., Kelly, J.D. and Cohen, E.H. (1983)
Transcription terminates in yeast distal to a control sequence
Cell 33, 607-614

- Henikoff, S. and Cohen, E.H. (1984)
Sequences responsible for transcription termination on a gene segment in *Saccharomyces cerevisiae*
Mol. Cell. Biol. 4, 1515-1520
- Hereford, L. and Rosbash, M. (1977)
Number and distribution of polyadenylated RNA sequences in yeast
Cell 10, 453-462
- Hereford, L., Fahrner, K., Woolford, Jr., Rosbash, M. and Kaback, D.B. (1979)
Isolation of yeast histone genes H2A and H2B
Cell 18, 1261-1271
- Hereford, L., Osley, M.A., Ludwig, J.R. II and McLaughlin, C.S. (1981)
Cell-Cycle regulation of yeast histone mRNA
Cell 24, 367-375
- Hereford, L., Bromley, S. and Osley, M.A. (1982)
Periodic transcription of yeast histone genes
Cell 30, 305-310
- Hinnebush, A., Lucchini, G. and Fink, G.R. (1985)
A synthetic HIS4 regulatory element confers general amino acid control on the cytochrome c gene (CYC1) of yeast
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 498-502
- Hochschild, A., Irwin, M. and Ptashne, M. (1983)
Repressor structure and the mechanism of positive control
Cell 32, 319-325
- Hoekema, A., Kastelein, R.A., Vasser, M. and de Boer, H.A. (1987)
Codon replacement in the PGK1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: experimental approach to study the role of biased codon usage in gene expression
Mol. Cell. Biol. 7, 2914-2924
- Holm, C., Weeks-Wagner, D.W., Fangman, W.L. and Botstein, D. (1986)
A rapid, efficient method for isolating DNA from yeast
Gene 42, 169-173
- Hope, I.A. and Struhl, K. (1985)
GCN4 protein, synthesized in vitro, binds HIS3 regulatory sequences: implications for general control of amino acid biosynthetic genes in yeast
Cell 43, 177-188
- Ito, Y., Tomasselli, A.G. and Noda, L.H. (1980)
ATP:AMP phosphotransferase from baker's yeast
Eur. J. Biochem. 105, 85-92
- Jones, E.W. and Fink, G.R. (1983)
Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast
In: The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*, metabolism and gene expression (Strathern, J.N., Jones, E.W. and Broach, J.R., eds) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., pp 181-299

Johnston, M. (1987)

A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*

Microbiol. Rev. 51, 458-476

Jukes, T.H. (1978)

The amino acid code

Adv. Enzymol. 47, 375-433

Kador, P.F., Robison jr., W.G. and Kinoshita, J.H. (1985)

The pharmacology of aldose reductase inhibitors

Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 25, 691-714

Keegan, L., Gill, G. and Ptashne, M. (1986)

Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eucaryotic regulatory protein

Science 231, 699-704

Keng, T. and Guarente, L. (1987)

Constitutive expression of the yeast HEM1 gene is actually a composite of activation and repression

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 9113-9117

Kief, D.R. and Warner, J.R. (1982)

Coordinate control of synthesis of ribosomal ribonucleic acid and ribosomal protein during nutritional shift-up in *S. cerevisiae*

Mol. Cell. Biol. 1, 1007-1015

Kishi, F., Maruyama, M., Tanizawa, Y. and Nakazawa, A. (1986)

Isolation and characterization of cDNA for chicken muscle adenylate kinase

J. Biol. Chem. 261, 2942-2945

Kishi, F., Tanizawa, Y. and Nakazawa, A. (1987)

Isolation and characterization of two types of cDNA for mitochondrial adenylate kinase and their expression in *Escherichia coli*

J. Biol. Chem. 262, 11785-11789

Klebe, R.J., Harriss, J.V., Sharp, Z.D. and Duoglas, M.G. (1983)

A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast

Gene 25, 333-341

Korn, E.D. (1982)

Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells

Physiol. Rev. 62, 672-737

Kosterlitz, F.W. (1943)

The fermentation of galactose and galactose-1-PO

Biochem. J. 37, 322

Kotval, J., Zaret, K., Consaul, S. and Sherman, F. (1983)

Revertants of a transcription termination mutant of yeast contain diverse genetic alterations

Genetics 103, 367-388

Kuby, S.A., Palmieri, R.H., Frischat, A., Fischer, A.H., Wu, L.H., Maland, L. and Manship, M. (1984)
Studies on adenosine triphosphate transphosphorylases. Amino acid sequence of rabbit muscle ATP-AMP
Biochemistry 23, 2393-2399

Kwiatkowski, D.J. and Bruns, G.A.P. (1988)
Human profilin
J. Biol. Chem. 263, 5910-5915

Lassing, I. and Lindberg, U. (1985)
Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin
Nature 314, 472-474

Leer, R.J., van Raamsdonk-Duin, M.M.C., Molenaar, C.M.T., Cohen, L.H., Mager, W.H. and Planta, R.J. (1982)
The structure of the gene coding for the phosphorylated ribosomal protein S10 in yeast
Nucleic Acid Res. 10, 5869-5878

Leer, R.J., van Raamsdonk-Duin, M.M.C., Hagendoorn, M.J.M., Mager, W.H. and Planta, R.J. (1984)
Structural comparison of yeast ribosomal genes
Nucleic Acids Res. 12, 6685-6700

Leer, R.J., van Raamsdonk-Duin, M.M.C., Mager, W.H. and Planta, R.J. (1985)
Conserved sequences upstream of yeast ribosomal protein genes
Curr. Genet. 9, 273-277

Leloir, L.F. (1951)
The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivative
Arch. Biochem. 33, 186-190

Lewin, B. (1980)
Gene expression, vol. 2: eucaryotic chromosomes
J. Wiley & Sons, New York, pp. 694-727

Lindahl, L. and Zengel, J.M. (1982)
Expression of ribosomal genes in bacteria
Adv. Genet. 21, 53-121

Lipman, D.J. and Pearson, W.R.
Rapid and sensitive protein similarity searches
Science 227, 1435-1441

Lohr, D. and Hopper, J.E. (1985)
The relationship of regulatory proteins and DNaseI hypersensitive sites in the yeast GAL1-10 genes
Nucleic Acids Res. 13, 8409-8423

Lue, N.F., Chasman, D.I., Buchman, A.R. and Kornberg, R.D. (1987)
Interaction of GAL4 and GAL80 gene regulatory proteins in vitro
Mol. Cell. Biol. 7, 3446-3451

Lycan, D.E., Osley, M.A. and Hereford, L.M. (1987)
Role of transcriptional and posttranscriptional regulation in expression of histone genes in *Saccharomyces cerevisiae*
Mol. Cell. Biol. 7, 614-621

Ma, J. and Ptashne, M. (1987a)
Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments
Cell 48, 847-853

Ma, J. and Ptashne, M. (1987b)
A new class of yeast transcriptional activators
Cell 51, 113-119

Ma, J. and Ptashne, M. (1987c)
The carboxy-terminal 30 amino acids of GAL4 are recognized by GAL80
Cell 50, 137-142

Magdolen, V. (1985)
Versuche zur Isolierung Häm-regulierter Hefegene
Diplomarbeit, Universität München

Magdolen, V., Oechsner, U. and Bandlow, W. (1987)
The complete nucleotide sequence of the gene coding for yeast adenylate kinase
Curr. Genet. 12, 405-411

Magdolen, V., Oechsner, U., Müller, G. and Bandlow, W. (1988)
The intron containing gene for yeast profilin (PFY) encodes a vital function eingereicht zur Veröffentlichung

Magdolen, V., Oechsner, U., Trommler, P. and Bandlow, W. (1988)
Expression of a novel yeast protein with homology to mammalian aldo/keto reductases is controlled by galactose at the transcriptional level in Vorbereitung

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982)
Molecular cloning
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Marres, C.A.M., van Loon, A.P.G.M., Oudshoorn, P., van Steeg, H., Grivell, L.A. and Slater, E.C. (1985)
Nucleotide sequence analysis of a nuclear gene coding for manganese superoxide dismutase of yeast mitochondria, a gene previously assumed to code for the Rieske iron-sulphur protein
Eur. J. Biochem. 147, 153-161

Matsuura, S., Arpin, M., Hannum, C., Margoliash, E., Sabatini, D.D. and Morimoto, T. (1981)
In vitro synthesis and posttranslational uptake of cytochrome c into isolated mitochondria: role of a specific addressing signal in the apocytochrome
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 4368-4372

McKnight, G.L. and McConaughy, B.L. (1983)
Selection of functional cDNAs by complementation in yeast
Proc. Natl. Acad. USA 80, 4412-4415

McNeil, J.B. and Smith, M. (1986)

Transcription initiation of the *Saccharomyces cerevisiae* Iso-1-cytochrome c gene: multiple, independent T-A-T-A sequences
J. Mol. Biol. 187, 363-378

McNeil, J.B. (1988)

Functional characterization of a pyrimidine-rich element in the 5'-noncoding region of the yeast iso-1-cytochrome c gene
Mol. Cell. Biol. 8, 1045-1054

Mihara, K., Blobel, G., and Sato, R. (1982)

In vitro synthesis and integration into mitochondria of porin, a major protein of the outer mitochondrial membrane of *Saccharomyces cerevisiae*
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 7102-7106

Miller, A.M. (1984)

The yeast *MATa1* gene contains two introns
EMBO J. 3, 1061-1065

Miller, J.H. (1972)

Assay of β galactosidase
In: "Experiments in Molecular Genetics" (Miller, J. H., ed) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 352-355

Möller, W. and Amons, R. (1985)

Phosphate-binding sequences in nucleotide-binding proteins
FEBS 186, 1-7

Molenaar, C.M.T., Woudt, L.P., Jansen, A.E.M., Mager, W.H and Planta, R.J. (1984)

Structure and organization of two linked ribosomal protein genes in yeast
Nucleic Acids Res. 12, 7345-7358

Montgomery D.L., Leung D.W., Smith M., Shalit P., Faye G. and Hall B.D. (1980)

Isolation and sequence of the gene for iso-2-cytochrome c in *Saccharomyces cerevisiae*
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 541-545

Morjana, H.A., Lyons, C. and Flynn, T.G. (1987)

Chemical modification of human muscle aldose reductase by pyridoxal 5'-phosphate
Fed. Proc. 46, 2154

Moxon, L.W. and Holmes, R.S. (1987)

Lung carbonyl reductase in the mouse: biochemical and catalytic properties
In Weiner, H., Flynn, T.G. (eds): "Enzymology of carbonyl metabolism: aldehyde dehydrogenase, aldo-keto reductase and alcohol dehydrogenase", A.R. Liss, New York, pp. 383-399

Musso, R., DiLauro, R. Rosenberg, M. DeCrombrughe, B. (1977)

Nucleotide sequence of the operator-promoter region of the galactose operon of *Escherichia coli*
Proc. Natl. Sci. U.S.A. 74, 106-110

- Nasmyth, K.A. and Reed, S.J. (1980)
Isolation of genes by complementation in yeast: Molecular cloning of a cell-cycle gene
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 2119-2123
- Needleman, S.B. and Wunsch, C.D. (1970)
A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins
J. Mol. Biol. 48, 443-453
- Negm, F.B. (1986)
Purification and properties of an NADPH-aldehyde reductase (aldehyde reductase) from *Euonymus japonica* leaves
Plant Physiol. 80, 972-977
- Newman, A. (1987)
Specific accessory sequences in *Saccharomyces cerevisiae* introns control assembly of pre-mRNAs into spliceosomes
EMBO J. 6, 3833-3839
- Norris, D. and Osley, M.A. (1987)
The two gene pairs encoding H2A and H2B play different roles in the *Saccharomyces cerevisiae* life cycle
Mol. Cell. Biol. 7, 3473-3481
- Oechsner, U. (1986)
Transkriptionsregulation durch Häm in *Saccharomyces cerevisiae*: Versuche zur Isolierung und Charakterisierung nukleärer Hefegene
Diplomarbeit, Universität München
- Oechsner, U., Magdolen, V. and Bandlow, W. (1987)
The cDNA and deduced amino acid of profilin from *Saccharomyces cerevisiae*
Nucleic Acids Res. 15, 9078. Corrigendum, 1988. Nucleic Acids Res. 16, 1232
- Oechsner, U., Magdolen, V. and Bandlow, W. (1988)
A nuclear yeast gene (GCY) encodes a polypeptide with high homology to a vertebrate eye lens protein
FEBS Lett., in Druck
- Olesen, J., Hahn, S. and Guarente, L. (1987)
Yeast HAP2 and HAP3 activators both bind to the CYC1 upstream activation site, UAS2, in an interdependent manner
Cell 51, 953-961
- Oshima, Y. (1982)
Regulatory circuits for gene expression: the metabolism of galactose and phosphate
In: The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*, metabolism and gene expression (Strathern, J.N., Jones, E.W. and Broach, J.R., eds) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., pp. 159-180
- Osley, M.A. and Hereford, L. (1982)
Identification of a sequence responsible for periodic synthesis of yeast histone 2A mRNA
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 7689-7693

- Osley, M.A., Gould, J., Kim, S., Kane, M. and Hereford, L. (1986)
Identification of sequences in a yeast histone promoter involved in periodic transcription
Cell 45, 537-544
- Pai, E.F., Sachsenheimer, W., Schirmer, R.H. and Schulz, G.E. (1977)
Substrate positions and induced-fit in crystalline adenylate kinase
J. Mol. Biol. 114, 37-45
- Parikh, V.S., Clements, L.S., Scott, R.M., Morgan, M.M. and Butow, R.A. (1986)
Interactions between the mitochondrial and nuclear genomes that depend on the "state" of mitochondrial DNA
Yeast 2, 285
- Parikh, V.S., Morgan, M.M., Scott, R.M., Clements, L.S. and Butow, R.A. (1987)
The mitochondrial genotype can influence nuclear gene expression in yeast
Science 235, 576-580
- Petes, T.D. (1980)
Molecular genetics of yeast
Ann. Rev. Biochem. 49, 845-876
- Pfanner, M., Hoeben, P., Tropschug, M. and Neupert, W. (1987)
The carboxyl-terminal two-thirds of the ADP/ATP carrier polypeptide contains sufficient information to direct translocation into mitochondria
J. Biol. Chem. 262, 14851-14854
- Pfeifer, K., Arcangioli, B. and Guarente, L. (1987a)
Yeast HAP1 activator competes with the factor RC2 for binding to the upstream activation site UAS1 of the CYC1 gene
Cell 49, 9-18
- Pfeifer, K., Prezant, T. and Guarente, L. (1987b)
Yeast HAP1 activator binds to two different upstream activation sites of different sequence
Cell 49, 19-27
- Platt, T. (1986)
Transcription termination and the regulation of gene expression
Ann. Rev. Biochem. 55, 339-72
- Pollard, T.D. and Cooper, J.A. (1984)
Quantitative analysis of the effect of *Acanthamoeba* profilin on actin filament nucleation and elongation
Biochemistry 23, 6631-6641
- Pollard, T.D. and Cooper, J.A. (1986)
Actin and actin-binding proteins, a critical evaluation of mechanisms and functions
Ann. Rev. Biochem. 55, 987-1035
- Pollard, T.D. (1988)
Assembly and dynamics of the actin cytoskeleton
Eur. J. Cell. Biol. 46 (Supplement 22/Abstract), p. 90

- Post-Beittenmiller, M.A., Hamilton, R.W. and Hopper, J.E. (1984)
Regulation of basal and induced levels of the MEL1 transcript of *Saccharomyces cerevisiae*
Mol. Cell. Biol. 4, 1238-1245
- Proba, K., Tomasselli, A.G., Nielsen, P. and Schulz, G.E. (1987)
The cDNA sequence encoding cytosolic adenylate kinase from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)
Nucleic Acids Res. 15, 7187
- Ptashne, M., Jeffrey, A., Johnson, A.D., Maurer, R., Meyer, B.J., Pabo, C.O., Roberts, T.M. and Sauer, R.T. (1980)
How the λ repressor and cro work
Cell 19, 1-11
- Ratzkin, B. and Carbon, J. (1977)
Functional Expression of cloned yeast DNA in *Escherichia coli*
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 487-491
- Richter, K., Ammerer, G., Hartter, E. and Ruis, H. (1980)
The effect of δ -aminolevulinate on catalase T-messenger RNA levels in δ -aminolevulinate synthase-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*
J. Biol. Chem. 255, 8019-8022
- Riezman, H., Hase, T., van Loon, A.G.P.M., Grivell, L.A., Suda, K. and Schatz, G. (1983)
Import of proteins into mitochondria: a 70 kilodalton outer membrane protein with a large carboxy-terminal deletion is still transported to the outer membrane
EMBO J. 2, 2161-2168
- Rose, M.D., Novick, P., Thomas, J.H., Botstein, D. and Fink, G.R. (1987)
A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector
Gene 60, 237-243
- Rothstein, R.J. (1983)
One-step gene disruption in yeast
Meth. Enzymol. 101, 202-210
- Rubin, G.M. (1977)
The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* 5.8S ribosomal ribonucleic acid
J. Biol. Chem. 252, 8118-8125
- Schatz, P.J., Pillus, L., Grisafi, P., Solomon, F. and Botstein, D. (1986)
Two functional α -tubulin genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* encode divergent proteins
Mol. Cell. Biol. 6, 3711-3721
- Schmalix, W. (1985)
Versuche zur Induktion hämkontrollierter Gene und zur Translation von deren Transkripten in vitro
Diplomarbeit, Universität München

- Schmalix, W., Oechsner, U., Magdolen, V. and Bandlow, V. (1986)
Kinetics of the intracellular availability of heme after supplementing a heme-deficient yeast mutant with 5-aminolevulinate
Biol. Chem. Hoppe-Seyler 367, 379-385
- Schneider, J.C. and Guarente, L. (1987)
The untranslated leader of nuclear COX4 gene of *Saccharomyces cerevisiae* contains an intron
Nucleic Acids Res. 15, 3515-3529
- Schricker, R. (1986)
Charakterisierung der transkribierten Region der Klone QHC5 und QHC7
Diplomarbeit, Universität München
- Schulz, G.E., Schiltz, E., Tomasselli, A.G., Frank, R., Brune, M., Wittinghofer, A. and Schirmer, H. (1986)
Structural relationships in the adenylate kinase family
Eur. J. Biochem. 161, 127-132
- Serfling, E., Jasin, M. and Schaffner, W. (1985)
Enhancer and eukaryotic gene transcription
Trends Genet. 1, 224-230
- Siebenlist, U., Simpson, R.B. and Gilbert, W. (1980)
E. coli RNA polymerase interacts homologously with two different promoters
Cell 20, 269-281
- Sharp, P.M., Tuohy, T.M.F. and Mosurski, K.R. (1986)
Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes
Nucleic Acids Res. 14, 5125-5143
- Shimada, H. and Fukasawa, T. (1985)
Controlled transcription of the yeast regulatory gene GAL80
Gene 39, 1-9
- Shimizu, S., Hattori, S., Hata, H. and Yamada, H. (1988)
A novel fungal enzyme, NADPH-dependent carbonyl reductase, showing high specificity to conjugated polyketones
Eur. J. Biochem. 174, 37-44
- Sledziewski, A., Rytka, J., Bilinski, T., Hörtner, H. and Ruis, H. (1981).
Posttranscriptional heme control of catalase synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
Curr. Genet. 4, 19-23.
- Smith, M., Leung, D.W., Gillam, S., Astell, C.R., Montgomery, D.L. and Hall, B.D. (1979)
Sequence of the gene for iso-1-cytochrome c in *Saccharomyces cerevisiae*
Cell 16, 753-761
- Smith, M.M. and Andresson, O.S. (1983)
DNA sequences of yeast H3 and H4 histone genes from two nonallelic sets encode identical H3 and H4 proteins
J. Mol. Biol. 169, 663-690

- Spevak, W., Hartig, A., Meindl, P. and Ruis, H. (1986)
Heme control region of the catalase T gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*
Mol. Gen. Genet. 203, 73-78
- Sripati, C.E., Groner, Y. and Warner, J.R. (1976)
Methylated, blocked 5' termini of yeast mRNA
J. Biol. Chem. 251, 2898-2904
- St. John, T.P. and Davis, R.W. (1981)
The organization and transcription of the galactose gene cluster
Saccharomyces
J. Mol. Biol. 152, 285-315
- Stossel, T.P., Chaponnier, C., Ezzell, R.M., Hartwig, J.H., Janmey, P.A., Kwiatkowski, D.J., Lind, S.E., Smith, D.B., Southwick, F.S., Yin, H.L. and Zaner, K.S. (1985)
Nonmuscle actin-binding proteins
Ann. Rev. Cell. Biol. 1, 353-402
- Strobel, G., Magdolen, V., Oechsner, U., Huh, H. and Bandlow, W. (1988)
The 5'-upstream region of the yeast 25S rRNA gene contains a promoter element allowing expression in yeast and *E. coli*
Curr. Genet., im Druck
- Struhl, K. and Davis, R.W. (1981)
Transcription of the *his3* gene region in *Saccharomyces cerevisiae*
J. Mol. Biol. 152, 535-552
- Struhl, K. (1984)
Genetic properties and chromatin structure of the yeast gal regulatory element: an enhancer-like sequence
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 7865-7869
- Struhl, K. (1985a)
Naturally occurring poly(dA-dT) sequences are upstream promoter elements for constitutive promoter elements in yeast
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 8419-8423
- Struhl, K. (1985b)
Nucleotide sequence and transcriptional mapping of the yeast *pet56-his3-ded1* gene region
Nucleic Acids Res. 13, 8587-8601
- Struhl, K. (1986a)
Constitutive and inducible *Saccharomyces cerevisiae* promoters: evidence for two distinct molecular mechanisms
Mol. Cell. Biol. 6, 3847-3853
- Struhl, K. (1986b)
Yeast *HIS3* expression in *Escherichia coli* depends upon fortuitous homology between eukaryotic and prokaryotic promoter elements
J. Mol. Biol. 191, 221-229
- Struhl, K. (1987)
Promoters, activator proteins, and the mechanism of transcriptional initiation in yeast
Cell 49, 295-297

- Stuart, R.A., Neupert, W. and Tropschug, M. (1987)
Deficiency in mRNA splicing in a cytochrome c mutant of *Neurospora crassa*: importance of carboxy terminus for import of apocytochrome c into mitochondria,
EMBO J. 6, 2131-2137
- Tajima, M., Nogi, Y. and Fukasawa, T. (1986)
Duplicate upstream activating sequences in the promoter region of the *Saccharomyces cerevisiae* GAL7 gene
Mol. Cell. Biol. 6, 246-256
- Teem, J.L., Abovich, N., Kaufer, N.F., Schwindinger, W.F., Warner, J.R., Levy, A., Woolford, J., Leer, R.J., van Raamsdonk-Duin, M.M.C., Mager, W.H., Planta, R.J., Schultz, L., Friesen, J.D., Fried, H. and Rosbash, M. (1984)
A comparison of yeast ribosomal protein gene DNA sequences
Nucleic Acids Res. 12, 8295-8313
- Thompson-Jäger, S. and Domdey, H. (1987)
Yeast pre-mRNA splicing requires a minimum distance between the 5' splice site and the internal branch acceptor site
Mol. Cell. Biol. 7, 4010-4016
- Tomarev, S.I., Zinovieva, R.D., Dolgilevich, S.M., Luchin, S.V., Krayev, A.S., Skryabin, K.G. and Gause, G.G. (1984)
A novel type of crytallin in the frog eye lens
FEBS Lett. 171, 297-302
- Tomasselli, A.G., Mast, E., Janes, W. and Schiltz, E. (1986)
The complete amino acid sequence of adenylate kinase from baker's yeast
Eur. J. Biochem. 155, 111-119
- Torchia, T.E. and Hopper, J.E. (1986)
Genetic and molecular analysis of the GAL3 gene in the expression of the galactose/melibiose regulon of *Saccharomyces cerevisiae*
Genetics 113, 229-246
- Tsao, S.G.S., Brunk, C.F. and Pearlman, R.E. (1983)
Hybridization of nucleic acids directly in agarose gels
Anal. Biochem. 131, 365-372
- Tschopp, J.F., Emr, S.D., Field, C. and Schekman, R. (1986)
GAL2 codes for a membrane-bound subunit of the galactose permease in *Saccharomyces cerevisiae*
J. Bacteriol. 166, 313-318
- Turner, A.J. and Flynn, T.G. (1982)
The nomenclature of aldehyde reductases
In Weiner, H. and Wermuth, B. (eds): "Enzymology of carbonyl metabolism: aldehyde dehydrogenase and aldo/keto reductase", A.R. Liss, New York, pp. 401-402
- van Loon, A.P.G.M., de Groot, R.J., van Eyk, E., van der Horst, G.T.J. and Grivell, L.A. (1982)
Isolation and characterization of the nuclear genes coding for subunits of the yeast ubiquinol-cytochrome c reductase complex
Gene 20, 323-337

van Loon, A.P.G.M., de Groot, R.J., de Haan, M., Dekker, A. and Grivell, L.A (1984)

The DNA sequence of the nuclear gene coding for the 17-kd subunit VI of the yeast ubiquinol-cytochrome c reductase: a protein with an extremely high content of acid amino acids
EMBO J. 3, 1039-1043

Veldman, G. M., Klootwijk, J., van Heerikhuizen, H. and Planta, R. J. (1981)
The nucleotide sequence of the intergenic region between the 5.8S and 26S rRNA genes of the yeast ribosomal RNA operon. Possible implications for the interaction between 5.8S and 26S rRNA and the processing of the transcript
Nucleic Acids Res. 9, 4847-4862

Verdiere, J., Greusot, F., Guarente, L. and Slonimski, P. (1986)
The overproducing CYP1 and the underproducing hap1 mutations are alleles of the same gene which regulates in trans the expression of the structural genes encoding the iso-cytochrome c
Curr. Genetics 10, 339-342

von Zabern, I., Wittmann-Liebold, B., Untucht-Grau, R., Schirmer, R.H. and Pai, E.F. (1976)
Primary and tertiary structure of the principal human adenylate kinase
Eur. J. Biochem. 68, 281-290

Wallis, J.W., Hereford, L. and Grunstein, M. (1980)
Histone H2B genes of yeast encode two different proteins
Cell 22, 799-805

Watanabe, K. and Kubo, S. (1982)
Mitochondrial adenylate kinase from chicken liver
Eur. J. Biochem. 123, 587-592

Watanabe, K., Kinoshita, T., Kawai, N., Tashiro, N., Mori, T., Kubo, S. and Yamamoto, S. (1985)
Distribution of adenylate kinase isozymes in porcine tissues and their subcellular localization
Jpn. J. Vet. Sci. 47, 63-72

Watanabe, K., Fujii, Y., Nakayama, K., Ohkubo, H., Kuramitsu, S., Kagamiyama, H., Nakanishi, S. and Hayaishi, O. (1988)
Structural similarity of bovine lung prostaglandin F synthase to lens ϵ -crystallin of the European common frog
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 11-15

Watson, T. and Dixon, J. (1981)
Amino acid sequence homologies between the high-mobility-group proteins, HMG-T from trout testis and HMG-1 and -2 from calf thymus: is the poly-aspartic-glutamic acid polypeptid within the main chain?
Bioscience Reports 1, 167

Webster, M., Jin, J.R., Green, S., Hollis, M. and Chambon, P. (1988)
The yeast UAS_a is a transcriptional enhancer in human HeLa cells in the presence of the GAL4 trans-activator
Cell 52, 169-178

Weeds, A. (1982)
Actin-binding proteins - regulators of cell architecture and motility
Nature 296, 811-815

- Vermuth, B. (1982)
Human carbonyl reductases
In Weiner, H. and Vermuth, B. (eds): "Enzymology of carbonyl metabolism: aldehyde dehydrogenase and aldo/keto reductase", A.R. Liss, New York, pp. 261-274
- Vermuth, B. (1985)
Aldo-keto reductases
In Flynn, T.G. and Weiner, H. (eds): "Enzymology of carbonyl metabolism: aldehyde dehydrogenase and aldo/keto reductase, and alcohol dehydrogenase", A.R. Liss, New York, pp. 209-230
- Vermuth, B., Omar, A., Forster, A., di Francesco, C., Wolf, M., von Wartburg, J.-P., Bullock, B. and Gabbay, K.H. (1987)
Primary structure of aldehyde reductase from human liver
In Weiner, H., Flynn, T.G. (eds): "Enzymology of carbonyl metabolism: aldehyde dehydrogenase, aldo-keto reductase and alcohol dehydrogenase", A.R. Liss, New York, pp. 297-307
- Wieland, B., Tomasselli, A.G., Noda, L.H., Frank, R. and Schulz, G.E. (1984)
The amino acid sequence of GTP:AMP phosphotransferase from beef-heart mitochondria: extensive homology with cytosolic adenylate kinase
Eur. J. Biochem. 143, 331-339
- Wildeman, A.G., Rasquinha, I. and Nazar, R.W. (1986)
A "CAT" family of repetitive DNA sequences in *Saccharomyces cerevisiae*
J. Biol. Chem. 261, 13401-13403
- Wistow, G.J., Mulders, J.W.M. and de Jong, W.W. (1987)
The enzyme lactate dehydrogenase as a structural protein in avian and crocodilian lenses
Nature 326, 622-624
- Wistow, G. and Piatigorsky, J. (1987)
Recruitment of enzymes as lens structural proteins
Science 236, 1554-1556
- Wright, R.M., Dircks, L.K. and Poyton, R.O. (1986)
Characterization of COX9, the nuclear gene encoding the yeast mitochondrial protein cytochrome c oxidase subunit VIIa
J. Biol. Chem. 261, 17183-17191
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985)
Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors
Gene 33, 103-119
- Yocum, R.R., Hanley, S., West, R. and Ptashne, M. (1984)
Use of lacZ fusions to delimit regulatory elements of the inducible divergent GAL1-GAL10 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*
Mol. Cell. Biol. 4, 1985-1998
- Zaret, K.S. and Sherman, F. (1982)
DNA sequence required for efficient transcription termination in yeast
Cell 28, 563-573

- Zimmermann, R., Paluch, U., Sprinz, M. and Neupert, W. (1979)
Cell-free synthesis of the mitochondrial ADP/ATP carrier protein of
Neurospora crassa
Eur. J. Biochem. 99, 247-252
- Zimmermann, R. and Neupert, W. (1980)
Transport of proteins into mitochondria
Eur. J. Biochem. 109, 217-229
- Zitomer, R.S., Sellers, J.W., McCarter, D.W., Hastings, G.A., Wick, P. and
Lowry, C.V. (1987)
Elements involved in oxygen regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* CYC7
gene
Mol. Cell. Biol. 7, 2212-2220
- Zuker, M. and Stiegler, P. (1981)
Optimal computer folding of large RNS sequences using thermodynamics and
auxiliary information
Nucleic Acids Res. 9, 133-145

VIELEN DANK!

Am Ende dieser Arbeit gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. W. Bandlow für die Aufgabenstellung und Betreuung der Arbeit, sowie für die Geduld am Mikromanipulator bei der Tetradenanalyse.

Zu großem Dank bin ich Frau G. Strobel verpflichtet, die mir jederzeit - besonders bei der Herstellung und Untersuchung der rDNA/lacZ-Fusionsgene, bei der Konstruktion und Analyse der Hefedisruptionsmutanten und bei der Anfertigung der Abbildungen - mit Rat und Hilfe zur Seite stand.

Bei meinem "Mitstreiter" U. Oechsner und allen anderen Mitarbeitern möchte ich mich für die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie das angenehme Arbeitsklima bedanken.

H. Germeier, J. Hermann, T. Meier, U. Kriwan, P. Trommler, G. Mages, B. Millauer, H.-P. Halbritter und P. Lang danke ich für die rege Mitarbeit und das entgegengebrachte Interesse während ihres Großpraktikums in unserem Labor.

J. Kellermann und U. Magdolen ermöglichten mir unbürokratisch die Durchführung der Computerprogramme im Max Planck-Institut für Biochemie, Martinsried.

Für die in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung danke ich meiner Frau und meinen Eltern.

LEBENS LAUF

Viktor Magdolen

geboren am 26. 4. 1957 in München

1963-1968	Volkschule München
1968-1977	Besuch des Luitpoldgymnasiums München, Naturwissenschaftlicher Zweig
1977	Abitur
1977-1983	Studium der Biologie an der Ludwig- Maximilians Universität in München
1983-1985	Diplomarbeit am Institut für Genetik der Universität München bei Prof. Dr. W. Bandlow Studienabschluß mit Diplom in Biologie
1985	Beginn der Dissertationsarbeit am gleichen Institut bei Prof. Dr. W. Bandlow
1986	Eheschließung mit Ursula Schwarz

